

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und
Molekularbiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Tiedge

Untersuchungen zur EPO-abhängigen Regulation des Glutamatrezeptors delta 1

(Themenvergebender: PD Dr. rer. nat. Thomas Bittorf)

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Martin Reinhardt,
geb. am 31.08.1987 in Friedrichroda

Rostock, im April 2019

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002607



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0
International Lizenz.

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Thomas Bittorf (Universitätsmedizin Rostock, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie)

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Noack (Universitätsmedizin Rostock, Oscar Langendorff Institut für Physiologie)

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jochen Neuhaus (Universitätsklinikum Leipzig, Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie)

Datum der Verteidigung: 03.12.2019

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Rostock, 08.04.2019

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift unterstützt und motiviert haben.

Zunächst gebührt mein Dank meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Thomas Bittorf für die Vergabe des Themas, die Geduld bei der Betreuung, hilfreiche Anregungen und konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit.

Allen Kollegen des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die vielen Tipps und Tricks im alltäglichen Umgang bei zahlreichen Experimenten und die wohlwollende, unterstützende Atmosphäre.

Ich danke meiner Arbeitskollegin Frau Dr. rer. hum. Katja Wunsch für die emotionale und motivationale Unterstützung bei gemeinsamen „Promotionsrunden“. Den anderen Teilnehmern und allen, die sich fragen, ob eine Promotion neben Beruf, Familie und allen widrigen Umständen machbar ist, sei gesagt: Ja, mit Unterstützung und Ausdauer!

Hinsichtlich PC-technischer Belange und Hilfen bei Formatierung und Layout sowie Endkorrekturen möchte ich mich bei Tilman und Elisa Neuhaus bedanken.

Meiner Frau Katrin Reinhardt und meinen Eltern und Schwiegereltern verdanke ich Zeit, das Aushalten von „Promotionskrisen“ und jede denkbare familiäre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Stand der Forschung	3
2.1 Erythropoetin und Erythropoetinrezeptor	3
2.1.1 Erythropoetin	3
2.1.2 Erythropoetinrezeptor	5
2.1.3 Signaltransduktion	5
2.2 Glutamatrezeptoren.....	8
2.2.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren	8
2.2.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren	8
2.2.3 Delta-Untereinheiten.....	9
2.3 Erythropoetinabhängige Effekte im Zentralnervensystem	12
3 Zielsetzung.....	16
4 Material und Methoden.....	17
4.1 Zelllinien.....	17
4.1.1 Ba/F3 und Subklone.....	17
4.1.2 HEK293 und Subklone	17
4.1.3 ST14A und Subklone.....	17
4.1.4 Andere Zelllinien	18
4.2 Zellkulturtechniken.....	18
4.2.1 Zellkultur	18
4.2.2 Zellgewinnung (adhärente Zellen).....	19
4.2.3 Einfrieren von Zellen	19
4.2.4 Transiente Transfektion (Elektroporation)	19
4.2.5 Reportergenassay	20
4.3 Nukleinsäureverfahren.....	21
4.3.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	21
4.3.2 Isolierung von genomischer DNA	22
4.3.3 PCR.....	22

4.3.4 Klonierung von DNA.....	25
4.3.5 Transfer von Plasmid-Vektoren in kompetente E. coli-Bakterien.....	29
4.3.6 Agarosegelelektrophorese.....	29
4.3.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	30
4.3.8 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen	30
4.3.9 Sequenzanalyse	32
4.4 Proteinchemische Verfahren: Proteinnachweis mittels Immunoblotting	33
4.4.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten	33
4.4.2 Immunpräzipitation.....	33
4.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
4.4.4 Blotting	35
4.4.5 Immunreaktionen	36
4.4.6 Detektion mittels <i>enhanced chemiluminescence</i> (ECL)	36
4.5 Datenverarbeitung und verwendete Programme.....	36
5 Ergebnisse.....	37
5.1 Induktion des Grid1-Gens durch EPO und Hypoxie	37
5.1.1 EPO-abhängige Induktion von Grid1 in Zelllinien aus verschiedenen Spezies	37
5.1.2 Induktion von Grid1 durch Hypoxie in HEK293-Zellen.....	38
5.2 Analyse der Grid1-Induktion auf Transkriptionsebene	39
5.2.1 Klonierung des Grid1-Promotors der Ratte aus genomischer DNA.....	39
5.2.2 Herstellung von Reportergenkonstrukten	40
5.2.3 EPO-abhängige Induktion des Grid1-Promotors nach transienter Transfektion von Ba/F3-Zellen.....	41
5.2.4 Analyse von an der Grid1- Induktion beteiligten Signalwegen.....	42
5.3 Regulation der GluD1-Phosphorylierung durch EPO	48
5.3.1 Klonierung und Überexpression der Grid1-cDNA	48
5.3.2 EPO-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung des GluD1-Proteins nach Überexpression	50
5.4 Physische Assoziation von GluD1 mit ionotropen Glutamatrezeptoren	50
6 Diskussion.....	53

7 Zusammenfassung	61
8 Anhang.....	IV
8.1 DNA-Sequenzen der klonierten Grid1-Promotor-Fragmente der Ratte	IV
8.2 Verwendete PCR-Primer	VI
8.3 Abbildungsverzeichnis.....	VII
8.4 Tabellenverzeichnis	IX
8.5 Abkürzungsverzeichnis:.....	X
8.6 Literaturverzeichnis	XIV

1 Einleitung

Erythropoetin (EPO) ist ein Hormon, das die Bildung von Erythrozyten reguliert. Neben diesem schon seit Ende des 19. Jahrhunderts (Carnot und Deflandre 1906) bekannten Phänomen gibt es noch vielfältige EPO-abhängige Effekte in anderen Organen (Herz, Leber, Niere, Netzhaut, Bauchspeicheldrüse, Innenohr) und auch im Gehirn (Chateauvieux et al. 2011). Dabei spielt EPO schon in der in der embryonalen Entwicklung von Geweben, die anfällig für Sauerstoffmangel sind, eine Rolle, (Juul et al. 1999b), andererseits entfaltet es auch in ausdifferenzierten Geweben schützende Eigenschaften (z. B. Tamarelle et al. 2009).

Die durch EPO ausgelösten intrazellulären Signalwege sind, vor allem wegen der klinischen Bedeutung des Hormons, sehr aufwendig untersucht worden und gut beschrieben (Watowich 2011; Broxmeyer 2013). Die bisher identifizierten Effektorgene und -proteine variieren nach Gewebe und Differenzierungsgrad (Chateauvieux et al. 2011), die Zuordnung zu den durch EPO ausgelösten zellulären Vorgängen ist nur zum Teil möglich. Unter anderem wurde dabei das Grid1 (*glutamate-ionotropic-receptor-delta-1*)-Gen in einer Studie zur EPO-abhängigen Genexpression als Zielmolekül identifiziert (Büchse et al. 2006). Grid1 kodiert für die erstmalig 1992 beschriebene delta- Glutamatrezeptoruntereinheit GluD1 (Yamazaki et al. 1992). Die genauen Funktionen dieser delta-Untereinheiten sind bis heute nicht abschließend geklärt (Yuzaki und Aricescu 2017). Es konnte jedoch eine Beteiligung an klinischen Erscheinungsbildern gezeigt werden, vor allem bei neurologischen und neuropsychiatrischen Erkrankungen (z. B. Nenadic et al. 2012, oder Webb et al. 2017). Auch der Einfluß von EPO auf neurologische und neuropsychiatrische Erkrankungen wurde in verschiedenen Zusammenhängen untersucht (Nissenson 1992; Ehrenreich et al. 2007; Miskowiak et al. 2010; Miskowiak et al. 2014a; Miskowiak et al. 2014b; Huang et al. 2015). EPO vermittelt antiapoptotische, antientzündliche und angiogenetische Effekte, darüberhinaus hat es auch differenzierungsfördernde Eigenschaften. Ebenfalls ist bei der Anwendung von EPO eine Verbesserung der synaptischen Plastizität beschrieben (z. B. Almaguer-Melian et al. 2016).

Interessanterweise wurde auch für die delta-Glutamatrezeptoren eine Beteiligung an der Synaptogenese beschrieben (Gupta et al. 2015).

Die beschriebenen Daten werfen die Frage auf, ob eventuell EPO-abhängige Effekte im ZNS mit den Veränderungen der Grid1-Expression in Zusammenhang stehen.

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Induktion von Grid1 durch EPO und zur posttranslationalen Modifikation von GluD1 vorgestellt, um zum besseren Verständnis EPO-abhängiger Wirkungen im ZNS und der weiteren Aufklärung der Funktion von Grid1/GluD1 beizutragen.

2 Stand der Forschung

2.1 Erythropoetin und Erythropoetinrezeptor

2.1.1 Erythropoetin

Die ersten Beobachtungen, dass ein längerer Höhengaufenthalt und die damit einhergehende Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes zu einer Erhöhung der Erythrozytenzahl führt, wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts publiziert (Bunn 2013). Anfang des 20. Jahrhunderts kamen Vermutungen auf, dass dies über einen „humoralen Faktor“ vermittelt wird (Carnot und Deflandre 1906). Durch Organentfernungsversuche konnte gezeigt werden, dass die Nieren die Hauptbildungsstelle für diese Substanz - inzwischen übereinstimmend Erythropoetin (EPO) genannt - sind (Jacobson et al. 1957; Nathan et al. 1964). 1977 konnte erstmals humanes Erythropoetin aus Urin von Patienten mit aplastischer Anämie präpariert werden (Miyake et al. 1977). Es folgten Strukturanalysen, die Aufklärung der Aminosäuresequenz (Sherwood 1984; Lai et al. 1986) und eine Klonierung des entsprechenden Gens sowohl aus genomischer DNA, als auch aus cDNA (Lin et al. 1985; Jacobs et al. 1985). In der Folge war die Herstellung von humanem, rekombinantem Erythropoetin (rhEPO) in ausreichenden Mengen für die Forschung, aber vor allem auch zur Therapie möglich.

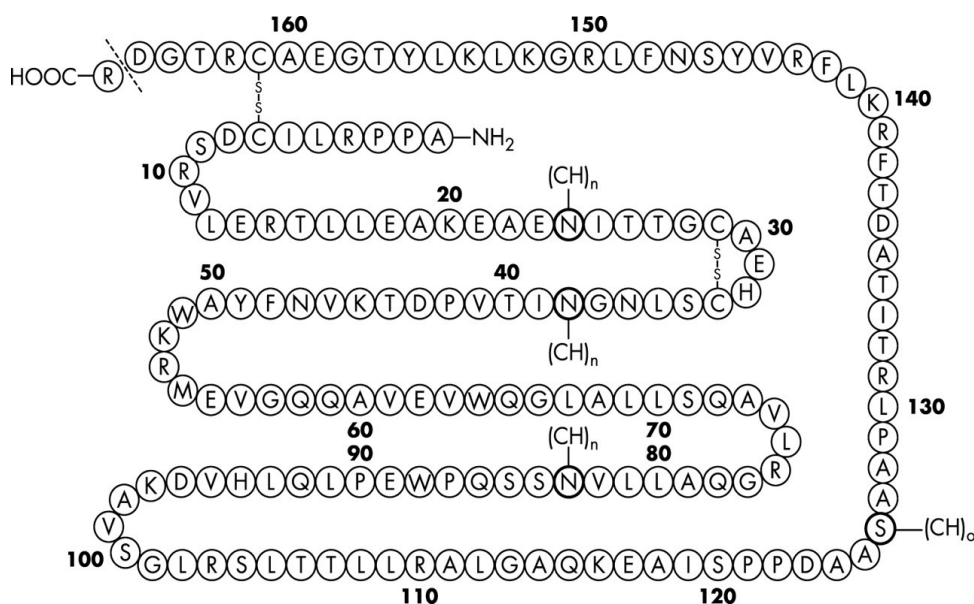


Abbildung 1 Primärstruktur von rekombinantem, humanem Erythropoetin (Ng et al. 2003)

Das 165 Aminosäuren lange Glykoprotein (Abbildung 1) wird beim Menschen zu 80% in peritubulären Fibroblasten der Niere gebildet. Ein zweiter Bildungsort ist die Leber, wo sowohl Hepatozyten als auch Ito-Zellen zur Expression fähig sind (Bunn 2013). Der Nachweis von EPO-mRNA und EPO-Protein in erythropoetischen Stammzellen sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen (Hermine et al. 1991; Stopka et al. 1998) lässt vermuten, dass es eine auto-/parakrin gesteuerte basale Erythropoese gibt, wohingegen der in Abbildung 2 gezeigte klassische endokrine Mechanismus bei hypoxischem Stress (Bunn 2013) im Zentrum steht.

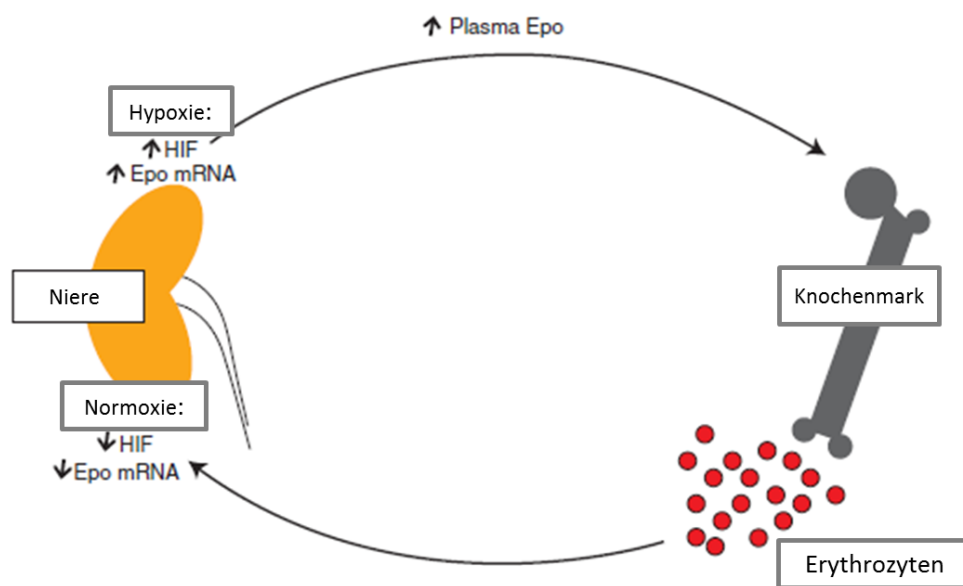


Abbildung 2 Regulation der Erythrozytenzahl durch EPO [modifiziert nach Bunn (2013)]:
Hypoxie führt in der Niere zu einer vermehrten Expression und Freisetzung von EPO und nachfolgendem Anstieg der Erythrozytenzahl, der resultierende Ausgleich der Hypoxie führt dann zu einer Normalisierung der EPO-Expression.

Die Erforschung der Regulation des EPO-Gens führte zur Entdeckung sauerstoffabhängiger Mechanismen, wobei dem *hypoxia-inducible-factor 1* (HIF1) eine wesentliche Rolle zukommt. Die Expression von HIF1 erfolgt konstitutiv, die sauerstoffabhängige Prolylhydroxylierung von HIF1 reguliert die ubiquitinabhängige Degradation des Transkriptionsfaktors. Bei Sauerstoffmangel akkumuliert demzufolge HIF1 in der Zelle und transaktiviert zusammen mit anderen Co-Transkriptionsfaktoren die Expression des EPO-Gens (Fandrey 2004).

Die EPO-Erythropoetinrezeptor-Interaktion auf hämatopoetischen Stammzellen vermittelt antiapoptotische, mitogene und differenzierungsinduzierende Effekte (Koury und Bondurant 1990). Auf die genauen intrazellulären Abläufe und die EPO-

Erythropoetinrezeptor-Interaktion, sowie auf nicht-hämatopoetische-Effekt von EPO soll in den nächsten Kapiteln eingegangen werden.

2.1.2 Erythropoetinrezeptor

Der Erythropoetinrezeptor (EPOR) gehört zur Klasse-1-Cytokin-Rezeptor-Familie (Wells und Vos 1996), in die auch die Rezeptoren verschiedener Interleukine (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7), des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF), des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF), des Wachstumshormons (GH) und des Prolaktins einzuordnen sind (Yoshimura und Arai 1996). In dieser Rezeptorfamilie erfolgt die Aktivierung durch Anlagerung des jeweiligen Liganden an Membranrezeptoren, welche aus identischen (Homodimere) oder verschiedenen Untereinheiten (Heterodimere / -trimere) bestehen. Der EPOR liegt in präformierten Homodimeren (Livnah 1999) mit einer relativ geringen Anzahl (~1000/Zelle) auf erythropoetischen Stammzellen vor (Bunn 2013). Es genügen picomolare Mengen des Liganden, um eine Aktivierung der Rezeptoren zu ermöglichen (Broxmeyer 2013). Die durch Ligandbindung hervorgerufene Konformationsänderung führt zu einer Annäherung der intrazellulären Domänen (Remy et al. 1999) und nachfolgend zur Aktivierung intrazellulärer Signalprozesse. Auf nicht-hämatopoetischen Zellen wurde ein Heterodimer aus EPOR und CD131 (der β -Untereinheit des IL-3, IL-5 und GM-CSF-Rezeptors) identifiziert, der nur bei deutlich höheren EPO-Konzentrationen aktiviert wird und für die gewebsprotektiven Effekte von EPO zuständig zu sein scheint (siehe auch 2.3) (Hand und Brines 2011).

2.1.3 Signaltransduktion

Die Besonderheit der Klasse-1-Cytokin-Rezeptor-Familie besteht darin, dass sie nicht über eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität verfügen, sondern reversibel mit cytosolischen Tyrosinkinasen assoziieren (Wells und Vos 1996). Die nachfolgenden Signalkaskaden sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

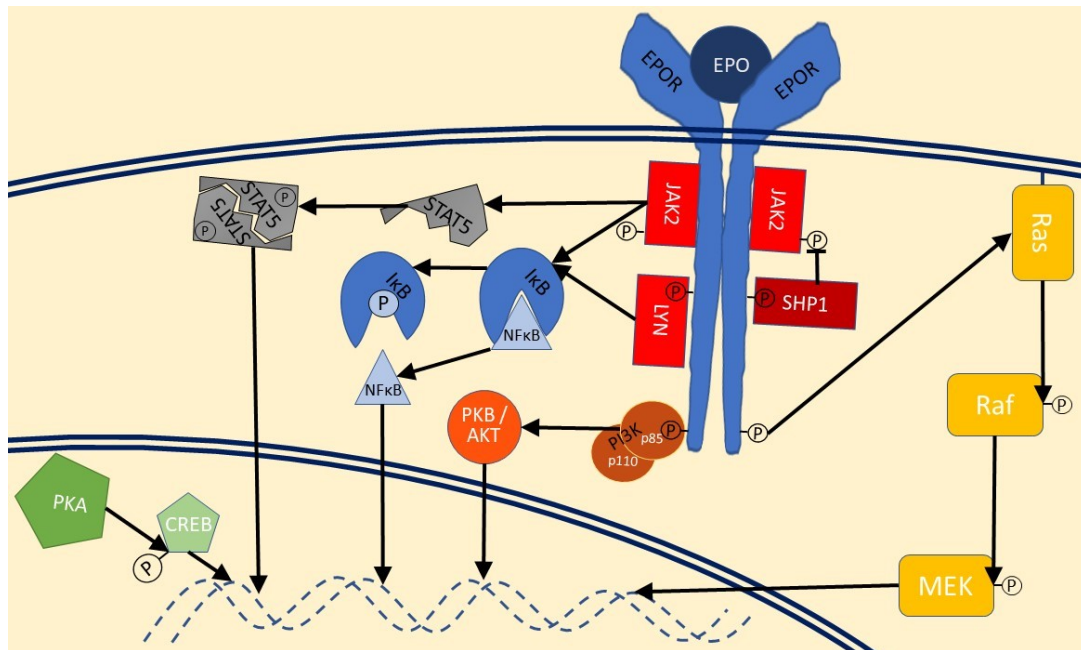


Abbildung 3 Schematische Darstellung der EPO-abhängigen Signaltransduktion

Der EPOR interagiert mit der Janus-Kinase 2 (JAK2) (Wells und Vos 1996). Die Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität erfolgt nach Bindung von EPO an den Rezeptor durch die oben beschriebene Konformationsänderung und Transphosphorylierung der Janus-Kinasen. Die Janus-Kinase 2 phosphoryliert anschließend Tyrosinreste in der membrandistalen intrazellulären EPOR-Domäne und schafft damit Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen (*src-homology 2 domains*). Der aktivierte EPOR-Komplex initiiert anschließend multiple Signalwege, u.a. den JAK2/STAT5 (*signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg. STAT5 bindet mithilfe einer SH2-Domäne an spezifische Phosphotyrosinreste des EPOR (Klingmüller 1997), wird dort durch JAK2 phosphoryliert und bildet nach Abdissoziation vom Rezeptor Homodimere, aber auch Heterodimere mit anderen STAT-Spezies. So wurde auch die Aktivierung von STAT1 und STAT3 am EPOR nachgewiesen (Chateaufvieux et al. 2011). Die entstehenden Komplexe reichern sich im Zellkern an und transaktivieren EPO-abhängige Gene (Klingmüller 1997).

Die zur Familie der Src-Proteinkinasen gehörende Proteinkinase Lyn ist ebenfalls an der Signaltransduktion des EPOR beteiligt. Es wurde gezeigt, dass Lyn in der Lage ist, sowohl am membranproximalen Teil des EPOR zu binden, als auch mit dem membrandistalen Teil zu interagieren (Chin et al. 1998). In Rezeptormutanten ohne vorhandene JAK2-Bindungsstelle ist die Aktivität von Lyn in der Signaltransduktion des EPOR jedoch eingeschränkt (Bittorf et al. 2001). Einerseits wird diskutiert, dass

Lyn zur Anlagerung an den EPOR JAK2 benötigt (Bittorf et al. 2001), andererseits wurde aber auch die physische Assoziation von Lyn mit dem membranproximalen Teil des EPOR bewiesen (Chin et al. 1998). Somit existiert mit Lyn eine weitere Proteinkinase im aktivierten Rezeptorkomplex. Es wurde gezeigt, dass Lyn an der Aktivierung von NF κ B (*nuclear factor kappa B*) in hämatopoetischen Zelllinien beteiligt ist (Bittorf et al. 2001). Gegenwärtig wird Lyn in den EPOR-Signalwegen als Signalverstärker interpretiert. (Chin et al. 1998).

Der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg wird durch Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 an einen Phosphotyrosinrest des Rezeptors eingeleitet und führt zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB / AKT), die ihrerseits verschiedene zelluläre Zielproteine reguliert (Chateauvieux et al. 2011).

Die Rekrutierung von Adapterproteinen an den Rezeptor führt darüber hinaus zur Aktivierung des membranständigen G-Proteins Ras und in der Folge zur Initiation der Ras/Raf/MEK-Signalkaskade, die vor allem mitogene Effekte vermittelt (Chateauvieux et al. 2011).

Die Termination rezeptorvermittelter Signale wird bereits durch Anlagerung der Tyrosinphosphatase SHP1 an den Rezeptorkomplex eingeleitet und resultiert in einer Dephosphorylierung von JAK2 und damit der überwiegend durch diese Kinase vermittelten intrazellulären Signaltransduktion (Yoshimura und Arai 1996).

Eine EPO-abhängige Aktivierung von NF κ B konnte sowohl für hämatopoetische als auch neuronale Zellen gezeigt werden, wobei in hämatopoetischen Zelllinien Lyn und nicht JAK2 als beteiligte Proteinkinase nachgewiesen werden konnte (Bittorf et al. 2001), in neuronalen Zellen hingegen konnte eine Aktivierung durch JAK2 gezeigt werden (Digicaylioglu und Lipton 2001). Letztendlich kommt es zu einer Phosphorylierung des *inhibitor of nuclear factor- κ B* (I κ B), damit zum Abdissoziieren des Transkriptionsfaktors NF κ B und zur Translokation in den Zellkern, wo NF κ B an der Regulation von antiapoptotischen Genen beteiligt ist (Karin 1999).

Eine Verstärkung der STAT5-abhängigen Genexpression konnte durch eine Aktivierung der PKA (z. B. mittels Prostaglandin E2) gezeigt werden (Boer et al. 2003), wobei sowohl das *cAMP response element-binding protein* (CREB) als Transkriptionsfaktor als auch der Koaktivator der Transkription *CREB-binding-protein* (CBP) beteiligt sind. Die EPO-abhängige STAT5 Transaktivierung verläuft allerdings PKA-unabhängig (Boer et al. 2002).

2.2 Glutamatrezeptoren

2.2.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren

Ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluR) sind die dominierenden Liganden-abhängig aktivierten Ionenkanäle an exzitatorischen Synapsen (Mayer 2005). Es gibt 3 Hauptfamilien: AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5 methyl-4-isoxazole propionic acid*)-, Kainat- und NMDA (*N-methyl-D-aspartic acid*)-Rezeptoren.

Die AMPA-Rezeptoren (Gene: GluR1 – 4) haben eine schnelle und kurze Bindungsantwort, desensitivieren stark, sind wenig Ca^{2+} -durchlässig und werden von intrazellulären Polyaminen geblockt.

Die NMDA-Rezeptoren (Gene: NR1, NR2A – D, NR3A, NR3B) zeigen hingegen eine langsame und länger anhaltende Bindungsantwort, desensitivieren schwach, sind stark Ca^{2+} -durchlässig und werden spannungsabhängig von intrazellulären Magnesiumionen geblockt (Wollmuth und Sobolevsky 2004).

Die Kainat-Rezeptoren (Gene: GluR5 – 7, KA1, KA2) zeigen bei verschiedenen Untereinheiten verschieden lange Bindungsantworten und unterschiedliches Desensitivierungsverhalten (Dingledine et al. 1999). Sie sind an der präsynaptischen Modulation der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt (Madden 2002).

Jedes Gen kodiert jeweils eine Untereinheit des Rezeptortetramers. Innerhalb der Familien sind verschiedene Kombinationen in vivo gefunden worden, aber nicht zwischen den Familien.

2.2.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren

Alle bisher bekannten metabotropen Glutamatrezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche eine große extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne besitzen und funktionelle Homodimere bilden (Bockaert und Pin 1999; Kew und Kemp 2005).

Sie werden anhand der DNA-Sequenz-Homologie, der pharmakologischen Beeinflussbarkeit und der induzierten second messenger in 3 Gruppen eingeteilt. (Wieronska et al. 2016) (siehe Tabelle 1)

Tabelle 1 Übersicht der metabotropen Glutamaterezeptoren und ihrer intrazellulären Signalwege

mGluR-Gruppe	G-Protein und vermittelter Signalweg	mGluR-Untereinheit
I	G _{q/11} ↑IP ₃ , DAG PKC	mGluR1
		mGluR5
II	G _{i/o} ↓cAMP PKA	mGluR3
		mGluR2
III	G _{i/o} ↓cAMP PKA	mGluR4
		mGluR6
		mGluR7
		mGluR8

2.2.3 Delta-Untereinheiten

Die delta-Untereinheiten sind entfernte Strukturverwandte der ionotropen Glutamaterezeptoruntereinheiten mit allerdings nur 18-25 % identischer Aminosäuresequenz (Dingledine et al. 1999).

Aufgrund des unklaren Bindungsverhaltens (fehlende Aktivierung durch bekannte ionotrope Glutamaterezeptor-Agonisten) wurden sie früher auch als orphan-Rezeptoren bezeichnet, in der Annahme, ein bisher unentdecktes endogenes Peptid würde daran binden (Schmid und Hollmann 2008).

Folgende delta-Untereinheiten sind bis jetzt bekannt:

Glutamat-Rezeptor-Delta-1-Untereinheit (Grid1, auch GluD1 oder GluRδ1)

Glutamat-Rezeptor-Delta-2-Untereinheit (Grid2, auch GluD2 oder GluRδ2)

In der vorliegenden Arbeit wurde zur besseren Unterscheidung von Gen und kodiertem Protein folgende Nomenklatur verwendet:

Gen:	Protein:
Grid1	GluD1
Grid2	GluD2

Zur Erforschung der Funktion von GluD2 fanden knock-out-Modelle Anwendung, welche nahelegen, dass die Rezeptoruntereinheiten an der Langzeit-Depression (LTD) im Kleinhirn beteiligt sind, aber auch an der Synaptogenese, sowie am Lernen und Koordinieren von Bewegungsabläufen (Schmid und Hollmann 2008). So verwundert es nicht, dass inzwischen auch Berichte von Mutationen im Grid2-Gen mit dem Phänotyp von klinischen Syndromen der cerebellären Ataxie (Utine et al. 2013) und spastischen Paraplegie (Maier et al. 2014) vorliegen.

Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass Grid2 in vielen Hirnregionen exprimiert wird und somit an multiplen Hirnfunktionen beteiligt sein könnte (Yuzaki und Aricescu 2017). Vor allem scheint GluD2 an der Regulation der synaptischen Organisation (sowohl prä- als auch postsynaptisch) und damit auch der synaptischen Plastizität von Parallelfaser-Purkinje-Zell- und MLI (*molecular layer interneuron*)-Purkinje-Zell-Synapsen beteiligt zu sein.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Grid1/GluD1-Untereinheit wurde zuerst von Yamazaki et al. 1992 beschrieben.

Grid1 wird bei jungen Mäusen und Ratten in höherem Ausmaß exprimiert als bei ausgewachsenen, darüber hinaus ändert sich der vorrangige Expressionsort (Lomeli et al. 1993; Magdaleno et al. 2006; Lein et al. 2007). Bei Jungtieren werden vor allem im Striatum und im anteroventralen Nucleus thalamicus hohe Grid1-mRNA-Expressionsraten gefunden, wohingegen bei adulten Tieren Grid1 vorrangig im Innenohr und moderat im Hippocampus exprimiert wird (Yuzaki und Aricescu 2017). Im Innenohr ist GluD1 notwendig für das Hochfrequenzhören (Gao et al. 2007).

Auch hier zeigen neuere Untersuchungen, dass Grid1 in vielen (vor allem höheren) Hirnarealen auch im adulten Nagergehirn exprimiert wird (Hepp et al. 2015). Im Vergleich zu GluD2 findet sich GluD1 vorrangig im Cortex, GluD2 hingegen eher im Cerebellum. (Hepp et al. 2015)

Als gesichert kann angenommen werden, dass GluD1 an der synaptischen Organisation im Kleinhirn (Parallelfaser-MLI-Synapsen) (Konno et al. 2014; Yuzaki und Aricescu 2017), der Signalübertragung im Innenohr (Safieddine und Wenthold 1997; Gao et al. 2007; Yuzaki und Aricescu 2017) und der Signalübertragung im Vorderhirn (Kuroyanagi et al. 2009; Yuzaki und Aricescu 2017) beteiligt ist.

Viele Untersuchungen beim Menschen legen einen Zusammenhang von *single-nucleotid-polymorphisms* (SNPs) im Grid1-Gen mit multiplen psychiatrischen

Störungen wie Schizophrenie, depressiver Symptomatik bei Schizophrenie, *major depression* und Alkoholabhängigkeit nahe (Treutlein et al. 2009; Edwards et al. 2012; Nenadic et al. 2012; Chen et al. 2015; Livide et al. 2015; Webb et al. 2017; Yuzaki und Aricescu 2017; Zhang et al. 2018).

Grid1-knock-out Mäuse wurden als auffällig im Bereich Emotionen und Sozialverhalten beschrieben (Yadav et al. 2012). Ebenfalls konnten Veränderungen in der Expression anderer ionotroper Glutamatrezeptoren gefunden werden. Interessanterweise waren die Veränderungen sowohl auf Verhaltensebene als auch auf Expressionsebene durch pharmakologische Interventionen (Lithium und D-Cycloserin) mindestens teilweise umkehrbar.

Einige Untersuchungen fanden oder vermuten eine Beeinflussung von anderen Glutamatrezeptoruntereinheiten durch GluD1, welche am ehesten modulatorischer Art sind. Villmann et al. (1999) konnten nach Domänen-Austausch von vermuteten GluD1- und GluD2-Poren-Domänen in andere ionotrope Glutamatrezeptoren keine funktionierenden Rezeptoren herstellen, vermuten jedoch eine modulatorische Funktion. Unterstützend dazu zeigten Yadav et al. (2011), dass erst durch gezielte Mutationen in der eigentlich konservierten Transmembrandomäne 3 des GluD1 eine spontan geöffnete Variante hergestellt werden kann. Diese kann durch extrazelluläres Ca^{2+} noch weiter stabilisiert werden. Zumindest bei amakrinen Zellen der Säugetierretina wurde eine Assoziation mit Kainat-Rezeptoruntereinheiten nachgewiesen (Ghosh et al. 2001).

Hepp et al. (2015) weisen mittels Elektronenmikroskopie im Hippocampus von adulten Nagergehirnen das Vorkommen von GluD1 hauptsächlich in postsynaptischen Verdickungen von exzitatorischen Synapsen an Pyramidenbahnzellen nach. Eine Kollokalisierung mit mGluR5 auf Nervenzellen im Hippocampus und auf überexprimierenden HEK293 Zellen konnten Suryavanshi et al. (2016) zeigen. Ebenfalls fanden die Autoren eine verminderte mGlu5 Aktivität nach Grid1-knock-out, was sekundär zu einer verminderten mGlu5-vermittelten AMPA-Rezeptor-Internalisierung und somit zu einer Überexpression von AMPA auf den Nervenzellen führte.

Benamer et al. (2017) beschreiben eine Beeinflussung der langsamen glutamatergen Transmission durch GluD1 im Zusammenspiel mit mGluR1 und ziehen Rückschlüsse auf eine dopaminerge Dysfunktion bei Grid1-Gen-Veränderungen.

Durch die Modulation anderer glutamaterger Übertragungswege würde sich auch die Beteiligung von Grid1-Mutationen an der Pathogenese oben genannter (neuro-) psychiatrischer Störungen erklären.

Ein weiterer Aspekt ist die Beteiligung von GluD1 an der Bildung von Synapsen. Kuroyanagi et al. (2009) behaupten, dass die delta-Untereinheiten die Differenzierung glutamaterger präsynaptischer Endigungen induzieren. Yasumura et al. (2012) postulieren, dass GluD1 in Abhängigkeit von weiteren Botenstoffen (*cerebellin-precursor-protein 1 + 2*) vorrangig die inhibitorische präsynaptische Differenzierung von kortikalen Neuronen anregt.

Unterstützend dazu vermuten Ryu et al. (2012) nach Co-Zellkulturen mit GluD1-exprimierenden Zellen und neuronalen Zellen eine Beteiligung von GluD1 an der Bildung von sowohl exzitatorischen als auch inhibitorischen Synapsen im Hippocampus.

Gupta et al. (2015) fanden bei Grid1-knock-out Mäusen eine vermehrte Bildung und Verzweigung von Dendriten, was in einer höheren exzitatorischen Neurotransmission und mehr Synapsen im medialen präfrontalen Kortex mündet.

GluD1 und GluD2 sind fähig, mit ihrer C-terminalen Domäne in Interaktion mit anderen Proteinen, beispielsweise Zytoskelettproteine zu treten (Hirai und Matsuda 1999; Roche et al. 1999; Hironaka et al. 2000; Ly et al. 2002).

2.3 Erythropoetinabhängige Effekte im Zentralnervensystem

Zu Beginn der 1990er Jahre konnte ein positiver Effekt von EPO auf die kognitiven Fähigkeiten von Dialyse-Patienten gezeigt werden (Nissenson 1992). Dabei stand aber noch die Korrelation der kognitiven Fähigkeiten mit dem Hämatokrit, also direkt mit dem blutbildenden System, im Vordergrund. Nachdem eine direkte EPO-Expression und eine Expression des EPO-Rezeptors im Gehirn gezeigt werden konnten (Digicaylioglu et al. 1995; Juul et al. 1999b), lag die Vermutung einer direkten EPO-Wirkung im Gehirn nahe.

Ebenso konnte mittels EPO- oder EPOR-knock-out Mäusen eine tragende Rolle von EPO in der Hirnentwicklung nachgewiesen werden (Shingo et al. 2001; Tsai et al. 2006), wobei dieser Effekt sowohl im Schutz vor Hypoxie des sich entwickelnden

Gehirnes liegt, als auch direkten stimulierenden und differenzierenden Effekten auf Stammzellen geschuldet ist.

In verschiedenen Tiermodellen wurden protektive EPO-Effekte bei Hypoxie/Ischämie nachgewiesen (Wang et al. 2004; Tsai et al. 2006; Chatagner et al. 2010).

Die Hauptmechanismen sind dabei antiapoptotische, antientzündliche und angiogenetische Eigenschaften des Hormons, am positiven Outcome hinsichtlich neurologischer und kognitiver Funktionen dürften die oben bereits beschriebenen differenzierungsfördernden Wirkungen auf neuronale Stammzellen beteiligt sein (Wang et al. 2004; Chateauvieux et al. 2011). Abbildung 4 zeigt eine Zusammenfassung der neuroprotektiven EPO-Effekte.

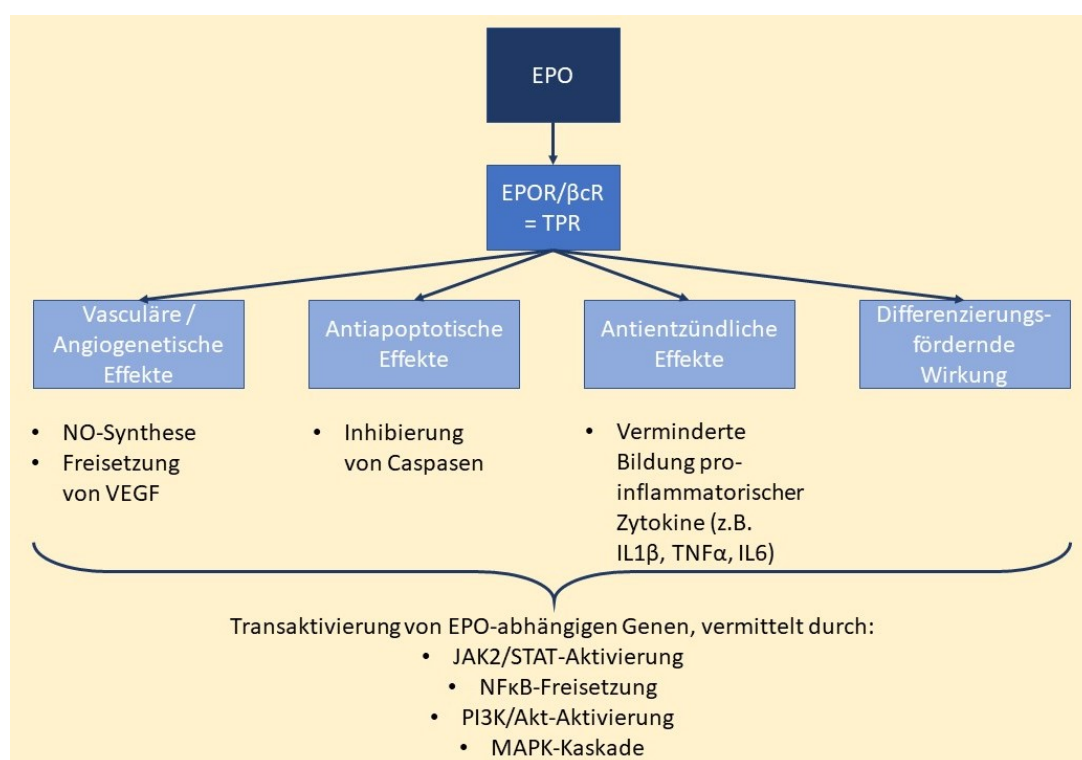


Abbildung 4 Zusammenfassung der neuroprotektiven EPO-Effekte

Durch die EPO-abhängige Aktivierung des EPOR/βcR werden vasculäre/angiogenetische, antiapoptotische, antientzündliche und differenzierungsfördernde Effekte ausgelöst, darunter sind beispielhaft die genauen Wirkungen aufgelistet.

Unter experimentellen hypoxischen Bedingungen sind sowohl Neuralzellen als auch Gliazellen in der Lage, EPO zu bilden. Aufgrund seiner Molekülmasse kann EPO nur in sehr geringem Maße die Blut-Hirn-Schranke überwinden. In verschiedenen klinischen Szenarien (intrazerebrale Blutung, Schlaganfall, Schädel-Hirn-Trauma, Depression) konnte eine Erhöhung von EPO im Liquor cerebrospinalis gefunden werden, was im Vergleich zum Blut-EPO-Spiegel Rückschlüsse auf eine eventuelle

intrathekale Synthese von EPO zulässt. Insgesamt ist von vorrangig parakrinen und autokrinen Effekten von EPO im ZNS auszugehen. (Dame et al. 2001)

Die benötigten EPO-Dosen zur Auslösung von gewebsschutzenden Effekten liegen weit höher. Das hängt möglicherweise damit zusammen, dass eine EPO-Rezeptor-Variante gefunden wurde, welche eine geringere Affinität zu EPO besitzt. Weitere Analysen zeigten, dass es sich dabei um ein Heterodimer aus EPOR und CD131, auch *β -common-receptor* (β cR) genannt, handelt (Hand und Brines 2011). Im Zusammenhang damit steht auch die Entwicklung nicht-hämatopoetisch wirksamer EPO-Derivate (Chateauvieux et al. 2011; Hand und Brines 2011).

Am besten untersucht sind die neuroprotektiven Effekte am Beispiel der cerebralen Hypoxie/Ischämie, des Schlaganfalls. Dieses gut studierte Beispiel soll auch hier stellvertretend für andere klinische Szenarien näher erläutert werden, dabei werden zur besseren Übersichtlichkeit vorrangig die proximalen EPO-abhängigen Signalwege besprochen.

Um den Bereich einer absoluten Ischämie im Gehirn befindet sich ein Risikobereich (*Penumbra*), der durch die hypoxischen Bedingungen für eine weitere Schädigung prädestiniert ist. In der *Penumbra* bilden Endothelzellen, intravasculäre Entzündungszellen und Neuronen EPO, der EPOR hingegen wird von Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen exprimiert (Sirén et al. 2001). Die Expression des EPOR geht der EPO-Bildung zeitlich voran, so dass das freigesetzte EPO auf entsprechend sensitive Gewebe Einfluss nehmen kann (Bernaudin et al. 1999). Zunächst wird die Mikrozirkulation der *Penumbra* durch endotheliale NO-Produktion aufrechterhalten, dies erfolgt durch eine PI3K/AKT-vermittelte Phosphorylierung und damit Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (Santhanam und Katusic 2006). Gleichzeitig wird durch EPO-abhängige antiapoptotische Mechanismen die Apoptose von hypoxiegefährdeten Zellen verhindert, z. B. durch AKT-vermittelte Hemmung von Caspase 3 und 9 (Chateauvieux et al. 2011), sowie durch die EPO-abhängige Transaktivierung antiapoptotischer Gene vorrangig über den JAK2/STAT-Signalweg, aber auch durch AKT-Aktivierung und unter Beteiligung von NF κ B wie bereits unter 2.1.3 beschrieben. EPO stimuliert darüberhinaus die Angiogenese (mittels PI3K/AKT- und MAPK- vermittelter Induktion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Wang et al. 2008), wodurch auch eine Einwanderung von neuronalen Stammzellen in das Infarktareal verbessert wird. Diese können sich unter dem Einfluss von weiterhin gebildetem EPO besser zu Astrozyten (Lee et al. 2004) oder Oligodendrozyten (Iwai

et al. 2010) ausdifferenzieren, oder generell der Neurogenese im Infarktareal dienen (Iwai et al. 2007).

Desweiteren reduziert EPO die neuronale Entzündung, z. B. durch verminderte Bildung von proinflammatorischen Zytokinen [z. B. IL1 β (Sun et al. 2005), TNF α und IL6 (Kumral et al. 2007)] und durch andere antientzündliche Mechanismen (Shen et al. 2009). Ebenfalls vermindert EPO das konsekutive Hirnödem durch Modulation von Aquaporinen in Astrozyten (Gunnarson et al. 2009). Auch in älteren Infarktarealen konnte eine persistierend erhöhte EPO-Bildung und EPO/EPOR Interaktion festgestellt werden (Sirén et al. 2001), was als sekundärpräventiver Mechanismus zu bewerten ist.

Die dargestellten Mechanismen werden auch zur Erklärung für die Wirksamkeit von EPO bei neuropsychologischen Defiziten im Rahmen schwerer psychiatrischer Erkrankungen herangezogen (Ehrenreich et al. 2007; Miskowiak et al. 2014a; Miskowiak et al. 2014b; Miskowiak et al. 2010)

3 Zielsetzung

Eine Induktion des Grid1-Gens durch EPO-abhängige Signale wurde erstmals in einer Studie zum Potential verschiedener EPOR-Strukturvarianten von Büchse et al. (2006) nachgewiesen. Aufbauend auf diesem Nachweis sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Ist dieses Phänomen auf die in der oben genannten Publikation verwendete murine Ba/F3-Zell-Linie beschränkt oder auch in Zelllinien anderer Spezies nachweisbar?
2. Kann Hypoxie (als Schlüsselreiz der EPO-Bildung) die Induktion der Transkription von Grid1-mRNA verstärken?
3. Welche EPO-abhängigen Signalwege sind für die Induktion der Transkription von Grid1 verantwortlich?
4. Existieren EPO-abhängige Signale, die zu posttranslationalen Modifikationen von GluD1 führen?
5. Ist die physische Assoziation von GluD1 mit anderen ionotropen Glutamaterezeptoruntereinheiten nachweisbar?

4 Material und Methoden

4.1 Zelllinien

4.1.1 Ba/F3 und Subklone

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Zellen der Linie Ba/F3 (RRID:CVCL_0161) (Warmuth et al. 2007) sowie ein Subklon (Ba/F3-EPOR), verwendet, dessen Zellen den murinen EPO-Rezeptor stabil überexprimieren und nach EPO-Kontakt mit Rezeptor-spezifischen Signalereignissen reagieren. Ba/F3-Zellen gehen auf eine aus dem Blut von BALB/c-Mäusen isolierte Zelllinie mit Pro-B-Zell-Charakteristik zurück und benötigen für ihr Wachstum die Anwesenheit des Zytokins Interleukin-3.

4.1.2 HEK293 und Subklone

HEK293 (*human embryonic kidney*)-Zellen (RRID:CVCL_0045) sind mit Adenovirus 5 transformierte, immortale, adhärent wachsende Zellen, die für Transfektionsexperimente gut geeignet sind und viele Gemeinsamkeiten mit neuronalen Vorläuferzellen besitzen (Graham et al. 1977).

In dieser Arbeit wurden neben parentalen HEK293-Zellen auch Subklone hergestellt und benutzt, welche den Ratten-Erythropoetin-Rezeptor (HEK293_rEPOR) und einen Hybridrezeptor aus humanem EGF-Rezeptor (extrazelluläre Domäne) und Maus-Erythropoetin-Rezeptor (trans- und intrazelluläre Domäne) stabil exprimieren (HEK293_EGF/EPOR) und somit für Stimulationsexperimente mit EPO bzw. EGF geeignet sind.

4.1.3 ST14A und Subklone

ST14A (RRID:CVCL_M588) sind immortale, temperatursensitive Zellen, die aus embryonalen striatalen Zellen von 14 Tage alten Rattenembryonen gewonnen wurden und retroviral mit einer temperatursensitiven Variante des *SV40 Large T Antigen* transfiziert wurden. Diese Zellen zeigen eine temperaturabhängige neuronale Differenzierung (Cattaneo und Conti 1998).

In dieser Arbeit wurde mit einem Subklon (ST14A_rEPOR) gearbeitet, der nach Transfektion mit einer cDNA für den Ratten-EPOR eine Überexpression des Proteins im Vergleich zu den parentalen Zellen zeigt.

4.1.4 Andere Zelllinien

Darüber hinaus wurden J2E-, PC12- und COS-Zellen verwendet. Folgende Tabelle zeigt die Spezies, den der Zelllinie entsprechenden Gewebetyp und den Erstbeschreiber der jeweiligen Zelllinie.

Tabelle 2 Weitere verwendete Zelllinien, deren Herkunftsspezies und -gewebe sowie Erstbeschreiber

Zelllinie	Spezies	Gewebe	Erstbeschreiber
J2E (RRID:CVCL_0355)	Maus	erythroid (immortalisiert auf Pro-Erythroblast-Ebene)	(Klinken et al. 1988)
PC12 (RRID:CVCL_0481)	Ratte	Nebenniere (Phäochromozytom) mit Fähigkeit zur neuronalen Differenzierung	(Greene und Tischler 1976)
COS-7 (RRID:CVCL_0224)	Primat (grüne Meerkatze)	Niere	(Gluzman 1981)

4.2 Zellkulturtechniken

4.2.1 Zellkultur

Zur Vorbereitung von Zellen für die Experimente wurden die Zellen in 50 ml- bzw. 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und bei 1000 U/min für 5 min abzentrifugiert (GS-6R Zentrifuge; Beckman). Für die Zellkultivierung wurden die Zellen alle 1-2 Tage in frisches Medium in einer Zelldichte von $2\text{-}3 \times 10^5$ Zellen/ml umgesetzt.

4.2.2 Zellgewinnung (adhärente Zellen)

Adhärente Zellen wurden durch kurze Trypsinierung (0,25% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS, pH 7,2) von den Kulturplatten abgelöst und dann wie unter 4.2.1. isoliert.

4.2.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen mit 2 ml Einfrierlösung (20 % DMSO und 80 % FKS) versetzt und in 2 ml-Kryoröhrchen (Greiner) überführt. Diese wurden in Kryogefäßen (Nalgene) auf $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und anschließend bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen zunächst auf Trockeneis überführt, anschließend im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Die mit Auftaulösung (Medium mit 20 % FKS) versetzten Zellen wurden abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der gewünschten Menge Medium resuspendiert und am nächsten Tag nochmals abzentrifugiert und in komplettem Medium aufgenommen.

4.2.4 Transiente Transfektion (Elektroporation)

Pro Transfektion wurden 1×10^7 Zellen eingesetzt.

Die Zellen wurden dreimal in serumfreiem Medium gewaschen, dann für 2 Stunden in Medium ohne Zusätze inkubiert (Konzentration 1×10^6 Zellen/ml).

Nach Abzentrifugieren wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/0,8 ml Medium in zusatzfreiem Medium aufgenommen, in eine 0,8 ml-Elektroporationsküvette mit 20 µg vorgelegtem Plasmid überführt, gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation (Gene Pulser; Biorad) bei 350 mV und 960 µF und danach eine Inkubation bei Raumtemperatur (5 min).

Die Zellen wurden dann in komplettem Medium aufgenommen, und in eine 24-well-Platte überführt (jeweils 1,5 ml pro well, die entsprechenden Zytokine und/oder Inhibitoren waren bereits vorgelegt). Danach wurden die Zellen für 4 Stunden inkubiert.

Zur Analyse wurden die Zellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 1 min bei 14000 U/min (Mikro 200; Hettich) abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend

abgesaugt, das Pellet mit 50 µl Lysepuffer (Promega) versetzt und sorgfältig resuspendiert. Bis zur Messung wurden die Lysate bei -20 °C gelagert.

4.2.5 Reportergenassay

Zur Untersuchung von putativen Promotorregionen wurde ein Reportergenassay durchgeführt. Dabei diente das Enzym Luciferase als Reportergen. Das zu untersuchende DNA-Fragment wurde in ein kommerzielles Reportergenkonstrukt (pGL3-basic von Promega, Abbildung 5) kloniert. Dieses Plasmid besitzt selbst keine Promotoraktivität, sodass allein die klonierte DNA-Sequenz die Induktion des Reportergens reguliert. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivität eines Promotors ziehen. Die Klonierung der vermeintlichen Promotorfragmente in das Plasmid erfolgte wie unter 4.3.4 angegeben.

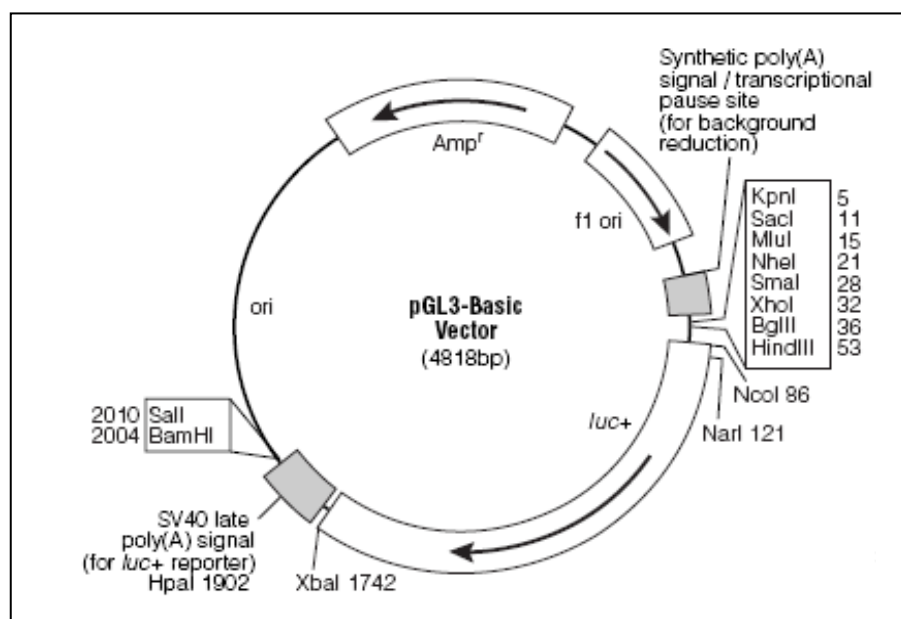


Abbildung 5 Vektorkarte pGL3-Basic [Promega]

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte nach Zugabe von 10 µl Lysatüberstand (nach 1 min Zentrifugation bei 14000 U/min) zu 50 µl Luciferase Assay Reagent (angesetzt nach Herstellerangaben; Promega) am Luminometer (Lumat LB 9506, Fa. EG&G Berthold) für 20 sec bei 25 °C. Pro Transfektion wurden jeweils drei Bestimmungen durchgeführt, Mittelwerte aus stimulierten sowie unstimulierten Ansätzen gebildet und die relative Stimulation berechnet.

4.3 Nukleinsäureverfahren

4.3.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA wurde mithilfe des TRIZOL-Reagenz isoliert (Chomczynski und Sacchi 1987). Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C und 15.000 U/min in einer Tischzentrifuge (Mikro 200R, Hettich). Die entsprechenden Zellen oder Gewebe wurden in 1 ml TRIZOL (Invitrogen) aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Nach Auftauen und sorgfältigem Suspendieren wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 0,2 ml Chloroform (J.T.Baker) versetzt, gemischt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min zentrifugiert. Dabei trennte sich eine obere, wässrige Phase (RNA) von einer unteren, organischen Phase (Proteine/DNA). Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, 0,5 ml Isopropanol (Promega) zugegeben, gut durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde dann für 10 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Waschen der gewonnenen RNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml 75 %- Ethanol, Resuspendieren des Pellets und 5 min Zentrifugation. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, erfolgte die Trocknung des RNA-Pellets unter dem Abzug und anschließend die Lösung der RNA in 30-50 µl Nuklease-freiem Wasser (Promega). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -70 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde zur weiteren Analyse mit Hilfe von Reverser Transkriptase cDNA hergestellt (Sambrook und Russell 2001). Alle hierzu nötigen Chemikalien wurden von der Firma Promega bezogen. Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg RNA eingesetzt, die mit 2 µl Oligo-(dT)-Primern (50 pmol/µl) versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt wurde. Das Gemisch wurde für 5 min bei 70 °C inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt. Nun erfolgte die Zugabe von 4 µl M-MLV Reaktionspuffer (5x), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 0,5 µl RNasin Plus RNase Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl). Pro RNA-Probe wurde je ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase zum Ausschluss eventuell vorhandener genomischer DNA verwendet. Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert und nachfolgend bei -20 °C gelagert.

4.3.2 Isolierung von genomischer DNA

Zur Extraktion von genomischer DNA aus Rattenblut wurde der E.Z.N.A Blood DNA Kit II der Firma Peqlab verwendet. Das Verfahren basiert auf den selektiven und reversiblen Bindungseigenschaften von Silikamembranen. Alle Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht anders beschrieben, für 1 min bei 8.000 g durchgeführt (Mikro 200; Hettich).

Für die Präparation wurde 1 ml Rattenblut mit 100 µl OB™Protease und 1ml BL-Puffer versetzt, sorgfältig gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde das Lysat mit 1040 µl Isopropanol (Promega) versetzt, auf eine HiBind®-DNA-Säule geladen und der Durchfluss nach Zentrifugation verworfen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 750 µl DNA-Waschpuffer beladen und zentrifugiert. Zum Trocknen der Säule wurde diese für 2 min bei 14.000 U/min zentrifugiert.

Die gebundene, gewaschene DNA wurde durch eine zweiminütige Inkubation mit 200 µl auf 70 °C vorgewärmten Elutionspuffer und anschließende Zentrifugation eluiert. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde photometrisch bestimmt, die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

4.3.3 PCR

Für Standard-PCRs wurden verwendet:

PCR Master Mix, 2X (Promega)	25 µl
upstream-Primer (50 pmol/µl)	1 µl
downstream-Primer (50 pmol/µl)	1 µl
Ausgangs-DNA (Endkonzentration < 250 ng)	1 – 5 µl
nukleasefreies Wasser (Promega)	auf 50 µl

Tabelle 3 Typisches PCR-Protokoll im Thermocycler (Sensoquest Labcycler)

Temperatur	Dauer	Anzahl d. Durchläufe
96 °C	2 min	1 x
96 °C	45 sec	30 x
$T_m - 5\text{ °C}$	45 sec	
72 °C	1 min pro 1 kb	
72 °C	5 min	1 x
4 °C	∞	

Amplifikation der Grid1-cDNA der Ratte

Zur Amplifikation der Grid1-cDNA wurden zwei überlappende Fragmente (Primer 1/2; Primer 3/4, Abbildung 6) aus Cortex-cDNA amplifiziert und später in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert (siehe 5.3.1). In der PCR wurden für beide Primerpaare die folgenden Bedingungen verwendet:

Temperatur	Dauer	Anzahl d. Durchläufe
96 °C	3 min	
96 °C	45 sec	35 Zyklen
57 °C	45 sec	
72 °C	2 min	
72 °C	3 min	
4 °C	∞	

Primer 1:	5'-GGTACC CCGGGACTGCACCGGGACC-3'
Primer 2:	5'-GGAACATACAATGAGCGTGAAGAGCC-3'
Primer 3:	5'-TCGGTGAACCTCTGTGGCCATGC-3'
Primer 4:	5'-CTCGAG CTCTGCTGGTCGGGTGGGCT-3'
Primer 5:	5'-GGTACCCCCGCCGCCTGCCCTTTAAG-3'
Primer 6:	5'-CCCAACCCAGCCCAGCCCA-3'
Primer 7:	5'-TCCGCAGTTCGCTCTTCGCC-3'
Primer 8:	5'-CTCGAGCCACAGCGTCAGCGCTTCCA-3'

Abbildung 6 Primer zur Klonierung der Grid1-cDNA aus Cortex-cDNA (Primer 1-4) und des Grid1-Promotors (Primer 5-8)

Amplifikation des Grid1-Promotors der Ratte

Wie schon bei der Amplifikation der Grid1-cDNA wurden zwei überlappende Fragmente (Primer 5/6; Primer 7/8, Abbildung 6) des Promotors amplifiziert und später gemeinsam subkloniert (siehe 5.2.1). Aufgrund der Probleme bei der Amplifikation GC-reicher Regionen wurde hier ein verändertes PCR-System eingesetzt (KAPA2G Robust PCR-Kit, Peqlab).

Typischer 25 µl-Ansatz:

Genomische Ratten-DNA	1 µl (190 ng)
KAPA2G™ Buffer A (5x)	5 µl
dNTP Mix (je 10 mM)	0,5 µl
KAPA2G™ Robust DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
KAPA Enhancer 1 (5x)	5 µl
Forward Primer	1 µl (5 pmol/µl)
Reverse Primer	1 µl (5 pmol/µl)
Nukleasefreies Wasser (Promega)	auf 25 µl

Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet:

Temperatur	Dauer	Anzahl d. Durchläufe
95 °C	3 min	
95 °C	45 sec	30 Zyklen
59 °C	15 sec	
72 °C	2 min	
72 °C	2 min	
4 °C	∞	

PCR zum Nachweis von Grid1 in cDNA-Präparationen

Für den Nachweis von Grid1 in cDNA-Präparationen wurde das oben beschriebene Standard-PCR-Verfahren eingesetzt. Die Primer waren für murine, humane und Ratten-Sequenzen verwendbar (Primer 10: 1 mismatch in humaner Sequenz).

Primer 9: 5'-GTGAATGAGGAAATCAGTGACCC-3'

Primer 10: 5'-CACAAAAGGCTCTTCCAAGACAG-3'

Alle individuellen Primer wurden mithilfe des Online-Tools „Primer-Blast“ erstellt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) und von der Firma BioTeZ Berlin Buch GmbH (www.biotez.de) bezogen.

4.3.4 Klonierung von DNA

4.3.4.1 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) genutzt. Dabei wurde das Prinzip der TA-Klonierung verwendet (TOPO TA Cloning ® Kit, Invitrogen). Es beruht auf der Präparation eines linearisierten Vektors, an dessen 3'-Desoxythymidin-Überhängen die Topoisomerase I des Vaccinia-Virus kovalent gebunden ist (siehe Abbildung 7). Die in der Phospho-Tyrosyl-Bindung konservierte Energie wird zur Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor benötigt.

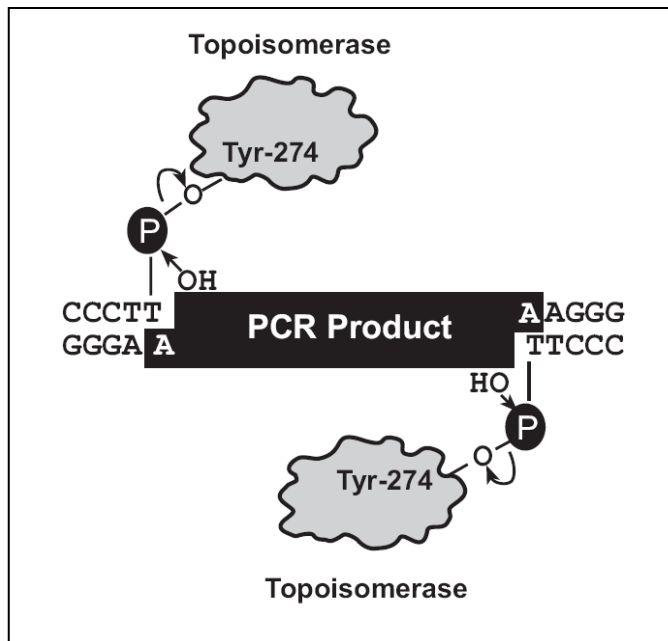


Abbildung 7 Kovalente Bindung der Topoisomerase I des Vaccinia-Virus am pCR2.1-TOPO-Vektor [Invitrogen]

Bei PCR-Produkten, die aus Reaktionen mit „proofreading“-Polymerasen stammten, wurde die Existenz der für die Klonierung notwendigen 3'-Adenosin-Überhänge durch eine zusätzliche Reaktion mit Taq-Polymerase abgesichert. Dazu wurden 10 µl des PCR-Produkts nach Extraktion und Reinigung aus dem Agarosegel mit 10 µl PCR Master Mix (Promega) versetzt und für 10 min bei 72 °C inkubiert. Zur eigentlichen Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor wurde folgender Ansatz hergestellt:

PCR-Produkt	0,5 – 4 µl
Salzlösung	1 µl
Nukleasefreies Wasser (Promega)	auf 5 µl
TOPO-Vektor	1 µl

Der Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend erfolgte die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen.

4.3.4.2 Restriktionsverdau

Zur Herstellung definierter DNA-Fragmente für Subklonierungen war der Einsatz von Restriktionsenzymen notwendig. Alle verwendeten Enzyme und zugehörigen Reagenzien wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

Verwendete Restriktionsenzyme: KpnI, XhoI, PvuII, AflII

Die Restriktionsansätze wurden nach folgendem Schema angesetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert:

Zu verdauende DNA	2 µg
Puffer (10x)	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl (10 U)
Nukleasefreies Wasser (Promega)	auf 20 µl

4.3.4.3 Klonierung von cDNA

Für die transiente und stabile Expression von cDNAs wurden entsprechende DNA-Fragmente in die Expressionsvektoren pcDNA3.1(+) (Invitrogen, siehe Abbildung 8) und pSELECT-puro-mcs (InvivoGen, siehe Abbildung 9) ligiert. Dabei werden lineare DNA-Fragmente (cDNA und linearisierte Plasmide) wieder zu zirkulären DNA Molekülen zusammengefügt. Das Ziel ist die Aufnahme des cDNA-Fragmentes in das Plasmid und damit eine Expression oder Vervielfältigung in den entsprechenden Zielzellen.

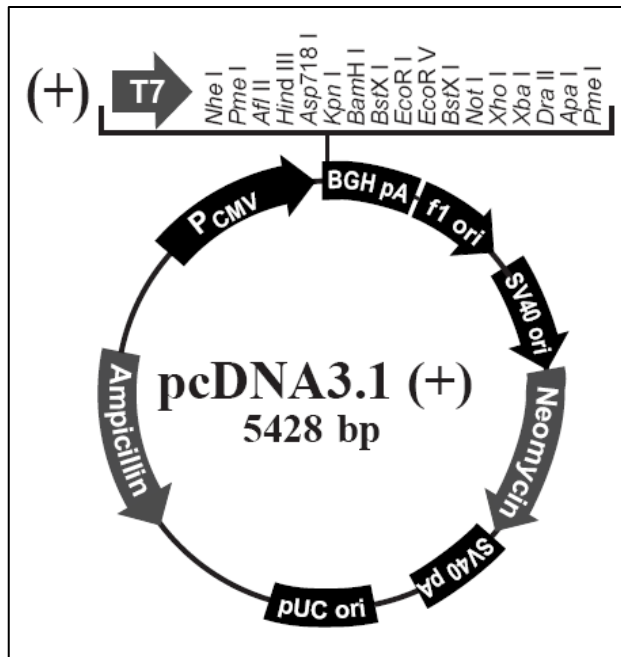


Abbildung 8 Vektorkarten pcDNA3.1 (+) [Invitrogen]

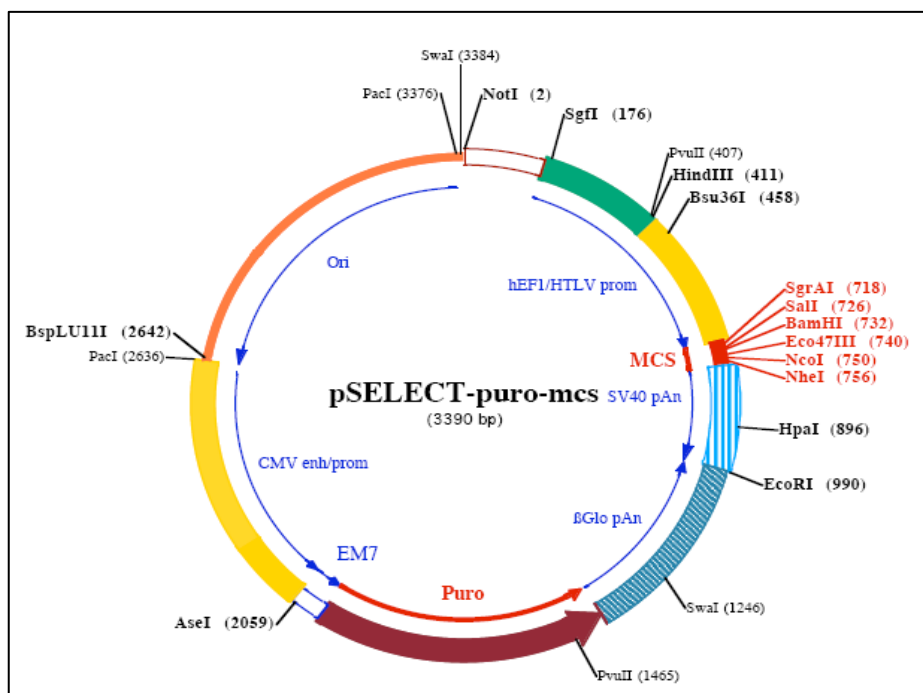


Abbildung 9 Vektorkarte pSELECT-puro-mcs [InvivoGen]

4.3.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von mit Restriktionsendonucleasen geschnittenen DNA-Fragmenten und das Ligieren eines Inserts in einen Vektor erfolgte mit dem LigaFast Rapid DNA Ligation System von Promega. Das molare Verhältnis Insert zu Vektor betrug etwa

1:2. Zur Errechnung der benötigten Masse des Inserts wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}} \times \text{Molarverhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{ng Insert}$$

Der 10 µl-Reaktionsansatz enthielt neben den DNA-Fragmenten (100 ng Vektor + errechnete Menge des Inserts) 3 Units T4-DNA-Ligase und 5 µl 2x Rapid Ligationspuffer. Die Ligation erfolgte durch Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 25 °C. Anschließend wurde der Ligationsansatz für die Transformation von kompetenten Zellen verwendet.

4.3.5 Transfer von Plasmid-Vektoren in kompetente E. coli-Bakterien

Zur Transformation wurden kompetente E. coli-Zellen der Firma Invitrogen (One Shot® TOP10) verwendet. 50 µl der Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 µl des Ligationsansatzes vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt, mit 250 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen) versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Selektierung und Kultivierung wurden dann 100 µl der Bakterienkultur auf eine LB-Agar-Platte [100 µg/ml Ampicillin und 40 µl X-gal-Lösung (40 mg/ml)] ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Rekombinante weiße Kolonien wurden durch eine Plasmid-Minipräparation und anschließende DNA-Sequenzierung verifiziert.

4.3.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten nach dem Molekulargewicht wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen elektrophoretisch separiert. Dazu wurde 1 g Agarose (UltraPure Agarose, Invitrogen) mit 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Danach wurde das abgekühlte, noch flüssige Agarosegel mit 5 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml, Bio-Rad) versetzt, gemischt und in einen Gelträger gegossen. Das ausgekühlte und erstarrte Agarosegel wurde in einer Elektrophoresekammer (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad) mit 0,5-fach TBE-Puffer überschichtet. Zum Beladen des Gels wurden die DNA-Proben

mit Ladepuffer (5-fach konzentriert: Glycerin 30 % v/v, 50 mM EDTA, 0,001% w/v Xylencyanol) gemischt. Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde parallel ein Größenmarker (2-Log DNA Ladder, NEB; oder: BenchTop PCR Markers, Promega) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden nach der Elektrophorese auf einem UV-Tisch (Dual Intensity Transilluminator, UniEquip) analysiert.

4.3.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN verwendet. Das gewünschte Gelstück wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Gewicht bestimmt. Anschließend wurde das 3-fache Volumen Puffer QG zu einem Volumen Gel gegeben (1 mg = 1 µl). Das Gel-Puffer-Gemisch wurde für 10 min bei 50 °C inkubiert und vollständig gelöst. Danach wurde 1 Gelvolumen Isopropanol zugegeben und gemischt. Zur Bindung der DNA an der QIAquick Säule wurde das Gemisch auf die Säule gegeben und für 1 min bei 14.000 U/min zentrifugiert (Hettich MIKRO 200). Anschließend wurde 0,5 ml Puffer QG auf die Säule gegeben und erneut für 1 min zentrifugiert. Nach einem Waschschriff (0,75 ml Puffer PE) wurde zum Trocknen der Säule ein weiterer Zentrifugationsschritt angeschlossen. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 40 µl nukleasefreiem Wasser (Promega), kurzer Inkubation und Zentrifugation. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde photometrisch bestimmt.

4.3.8 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Zur schnellen Überprüfung von transformierten E. coli-Zellen wurde eine Mini-Plasmidpräparation (1,5 ml Kulturvolumen) durchgeführt. Für die Präparation größerer Plasmidmengen (Maxiprep) wurde ein entsprechend größeres Kulturvolumen (400 ml) verwendet.

4.3.8.1 Plasmid-Mini-Präparation

Zur Mini-Plasmidpräparation wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (peQLab) eingesetzt. Dieses Kit basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse, kombiniert mit Zentrifugationssäulen, die eine feste Matrix zur Bindung der Plasmid-DNA enthalten.

Zunächst wurden je 1,5 ml LB-Medium mit Ampicillin mit der zu überprüfenden Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde dann für 1 min bei 14.000 U/min in einer Tischzentrifuge (Hettich Mikro 200) pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die alkalische Lyse durchgeführt. Dazu wurde das Pellet in 500 µl der Lösung I/RNaseA resuspendiert, mit 500 µl Lösung II versetzt und zum Mischen invertiert. Die Neutralisierung des Lysates erfolgte durch Zugabe von 700 µl Lösung III und Mischen durch Invertieren. Das entstandene flockige Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 14.000 U/min pelletiert. Die im Lysat enthaltene DNA wurde durch mehrmaliges Laden und Zentrifugieren (1 min bei 14.000 U/min) an die DNA-Säulen gebunden und einmal mit 500 µl PW Plasmid Buffer sowie zweimal mit je 750 µl DNA Wash Buffer gewaschen. Um eventuell verbliebene Ethanolreste zu entfernen, wurde die Zentrifugensäule für 2 min bei 14.000 U/min durch Zentrifugation getrocknet. Zum Eluieren wurde die Säule in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 50 µl nukleasefreies Wasser (Promega) direkt auf die Matrix pipettiert und für 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die gewonnene DNA wurde entweder durch Agarosegelelektrophorese oder direkte Sequenzierung überprüft.

4.3.8.2 Plasmid-Maxi-Präparation

Zur Maxi-Plasmidpräparation wurde das Kit NucleoBond PC 500 der Firma Macherey-Nagel verwendet. Auch dieses Verfahren beruht auf der alkalischen Zelllyse und der reversiblen Bindung von DNA an eine Anionenaustausch-Säule. Bei der Präparation wurde nach dem Herstellerprotokoll "High-copy plasmid purification" vorgegangen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, mithilfe der Avanti J-25 (Beckman) und dem Rotor JA-14 (Beckman). 400 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) beimpft mit einem E. coli-Klon wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Zum Ernten wurde die Kulturflüssigkeit bei 6.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 12 ml Puffer S1 + RNase A resuspendiert, mit 12 ml Puffer S2 durch Invertieren gemischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 4 °C kaltem Puffer S3 fiel ein weißgeflocktes Präzipitat aus, das durch Zentrifugation bei 13.000 g und 4 °C für 40 min pelletiert wurde. Der Überstand wurde mit einem mitgelieferten Faltnetz filtert und das Filtrat auf die mit 6 ml Puffer N2 equilibrierte NucleoBond®AX500 Säule

geladen. Nach einem Waschschrift (32 ml Puffer N3) wurde die gebundene DNA mit 15 ml Puffer N5 eluiert, mit 11 ml Isopropanol präzipitiert und für 45 min bei 9.500 g und 4 °C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde durch Zugabe von 5 ml Ethanol (70 %) gewaschen und anschließend für 20 min bei 9.500 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde für mindestens 20 min bei Raumtemperatur getrocknet, und anschließend in 200 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) resuspendiert. Die Konzentration wurde photometrisch am Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) bestimmt und die Identität der gewonnenen DNA per Sequenzierung validiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4.3.9 Sequenzanalyse

Zur Überprüfung von klonierten DNA-Fragmenten und zur Sequenzaufklärung wurde die DNA-Sequenzierungsmethode nach Sanger verwendet. Das in dieser Arbeit verwendete System GenomeLab GeXP (Beckman Coulter) beruht auf der Detektion von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs). Die Auftrennung der Sequenzierungsansätze erfolgt mittels Kapillarelektrophorese. Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Beckman Coulter bezogen. Pro Reaktionsansatz wurden 75 fmol (Plasmide) oder 50 fmol (gereinigte PCR Produkte), 5 pmol Primer und 4 µl DTCS Quick Start Master Mix eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit nukleasefreiem Wasser (Promega) auf 20 µl aufgefüllt. Folgende Bedingungen wurden im Thermocycler verwendet:

Temperatur	Dauer	Anzahl der Durchläufe	Hinweis
68 °C	5 min	1	Nur bei Plasmidsequenzierung verwendet
95 °C	1 min		
96 °C	20 sec	30 – 35	
50 °C	20 sec		
60 °C	4 min		
4 °C	∞		

Zur Aufreinigung nach der Sequenzierungsreaktion wurde das auf magnetischer Separation beruhende System CleanSEQ (Agencourt) verwendet. Zu jeder Probe

wurden 10 µl CleanSEQ-beads und 62 µl Ethanol (85%) hinzugefügt. Die Proben wurden zur Abtrennung der paramagnetischen Beads für 3 min in einer Ringmagnetplatte platziert. Nach der vollständigen Entfernung der Flüssigkeit wurde mit 100 µl Ethanol (85 %) für 30 s gewaschen. Nach erneutem vollständigem Entfernen der Flüssigkeit wurden die Proben aus dem Magnetfeld entfernt und mit 40 µl Sample Loading Solution versetzt. Zum Ablösen der an die beads gebundenen DNA-Proben wurden diese in der Sample Loading Solution resuspendiert. Vor dem Beladen des GenomeLab GeXP wurden die beads auf dem Boden der Probenröhrchen präzipitiert, und die Proben mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt. Die Sequenzierung erfolgte am GenomeLab GeXP mit je nach Bedarf angepasstem Sequenzierungsprogramm. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe des Programms BioEdit Version 7.0.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

4.4 Proteinchemische Verfahren: Proteinnachweis mittels Immunoblotting

4.4.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Für die hier beschriebenen Experimente wurden jeweils zwei konfluent mit ST14A-Zellen bewachsene Zellkulturflaschen (75 cm²) pro Ansatz verwendet. Nachdem das Medium abgezogen wurde, wurden die Zellen mit raumtemperiertem PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Flasche kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurden 500 µl Lysepuffer dazugegeben [1% (v/v) Triton X-100 in PBS mit Protease-Inhibitoren (complete Mini, Roche)], und für 5 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde mehrmals der Lysepuffer mit einem Schaber gleichmäßig verteilt. Das Lysat wurde abgenommen und für 20 min bei 4 °C geschüttelt. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde das Lysat für 20 min bei 14000 U/min und 4 °C abzentrifugiert.

4.4.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde zur spezifischen Anreicherung von Proteinen aus komplexen Proteingemischen, z. B. aus Zellkulturlysaten, verwendet. Darüber hinaus

war diese Methode auch die Grundlage für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen.

Pro Ansatz wurden 2 µg Primärantikörper eingesetzt, das Lysat-Antikörper-Gemisch wurde für 2 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert.

Die Abtrennung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte mit Hilfe von mit Protein A/G beschichteten magnetischen beads. Diese wurden mit Lysepuffer (s.o.) gewaschen und pro Ansatz (max. 500 µl) 25 µl Protein A/G beads (in Abhängigkeit vom Primärantikörper) dazu gegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach Positionierung im magnetischen Feld (ca. 30 sec) wurde der Überstand abgenommen und das Präzipitat dreimal mit 200 µl Lysepuffer gewaschen. Abschließend wurde das Präzipitat mit 30 µl 2fach Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 70 °C erhitzt. Vor dem Auftragen wurden die magnetischen beads im magnetischen Feld von der Probe separiert.

4.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen. Mit einem anschließenden Blotting-Verfahren ist eine qualitative Analyse der Proteine möglich.

Die Trenngele hatten je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine unterschiedliche Polyacrylamidkonzentrationen zwischen 6 und 10 %.

Tabelle 4 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für SDS-PAGE

Polyacrylamidgele	Trenngele			Sammelgel
	10 %	8 %	6 %	
H ₂ O _{dest}	16,3 ml	17,8 ml	19,6 ml	5,08 ml
Acrylamidstammlösung (40 %)	8,25 ml	6,7 ml	4,95 ml	1 ml
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	8,25 ml	8,25 ml	8,25 ml	2,08 ml
TEMED	17 µl	17 µl	17 µl	8,35 µl
APS	200 µl	200 µl	200 µl	29,2 µl

Tabelle 5 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

	Trenngelpuffer (pH = 8,8)	Sammelgelpuffer (pH = 6,8)
TRIS	36,33 g	6,06 g
SDS	0,8 g	0,4 g
H ₂ O _{dest}	ad 200 ml	ad 100 ml

Unmittelbar vor Gießen des Gels wurden TEMED und APS zugegeben.

Tabelle 6 Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers für SDS-PAGE

1 x Elektrophoresepuffer (pH = 8,3)	
TRIS	3,03 g
Glycin	14,1 g
SDS	1 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Als Ladepuffer für die Proben wurde Laemmli-Puffer (Biorad) verwendet, wobei die Proben 1:1 (v/v) mit Laemmli-Ladepuffer versetzt wurden. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 35 mA pro Gel über 4 Stunden oder bei 4 mA pro Gel über Nacht.

4.4.4 Blotting

Um eine Analyse der Proteine zu ermöglichen, wurden diese mit einem Tankblotsystem auf eine Trägermembran transferiert. Als Trägermembran wurde PVDF-Membran (Polyscreen®) verwendet, die vor dem Transfer 1 min in Methanol und 5 min in H₂O_{bidest} hydratisiert und in Transferpuffer überführt wurde.

Tabelle 7 Zusammensetzung des Transferpuffers zum Übertragen der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran

Transferpuffer	
TRIS	24,2 g
Glycin	115,2 g
Methanol	800 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 8000 ml

Der Proteintransfer erfolgte für 4 Stunden bei 400 mA, oder bei 200 mA über Nacht.

4.4.5 Immunreaktionen

Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Blocklösung inkubiert [0,1% (v/v) Tween 20 in PBS + 4 % BSA (w/v)]. Anschließend wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht bei leichtem Schütteln dem primären Antikörper exponiert. Nach Waschen der Membran [6 x 5 min mit 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS] erfolgte die Inkubation (1 Stunde bei Raumtemperatur) mit dem sekundären, Peroxidasegekoppelten Antikörper. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen [6 x 5 min mit 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS].

4.4.6 Detektion mittels *enhanced chemiluminescence* (ECL)

Die Detektion der geblotteten Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz (ECL Plus-Reagenz, Amersham). Dazu wurde die Membran gleichmäßig mit Detektionslösung benetzt, und mit einem Röntgenfilm (Curix HT1000G Plus, Agfa) in einer Dunkelkammer exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilmes erfolgte im Curix 60 von Agfa.

4.5 Datenverarbeitung und verwendete Programme

Die Datenerfassung und Vorauswertung sowie die Erstellung der Arbeit einschließlich Text, Tabellen und Grafikeinbettung erfolgte mittels Microsoft Office 2010. Die grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Reporterassays wurde dabei mittels graphpad prism 5.0 realisiert. Als Literaturverwaltungsprogramm und Zitierhilfe wurde Citavi Version 5 und 6 verwendet.

Hinsichtlich Formatierungs- und Layoutvorgaben wurden im Wesentlichen die Empfehlungen von Karmasin und Ribing (2014) umgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Induktion des Grid1-Gens durch EPO und Hypoxie

5.1.1 EPO-abhängige Induktion von Grid1 in Zelllinien aus verschiedenen Spezies

Zunächst wurde aus verschiedenen Zelllinien und dem Cortex der Ratte bzw. der Maus RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente in anschließenden PCR-Versuchen zum Nachweis der Grid1-Expression. In Abbildung 10 wird deutlich, dass Grid1 nur in einem Teil der verwendeten Zelllinien exprimiert wird. Als Positivkontrolle wurde Cortexgewebe von Maus und Ratte verwendet, die Integrität der RNA/cDNA wurde durch Amplifikation der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-cDNA überprüft.

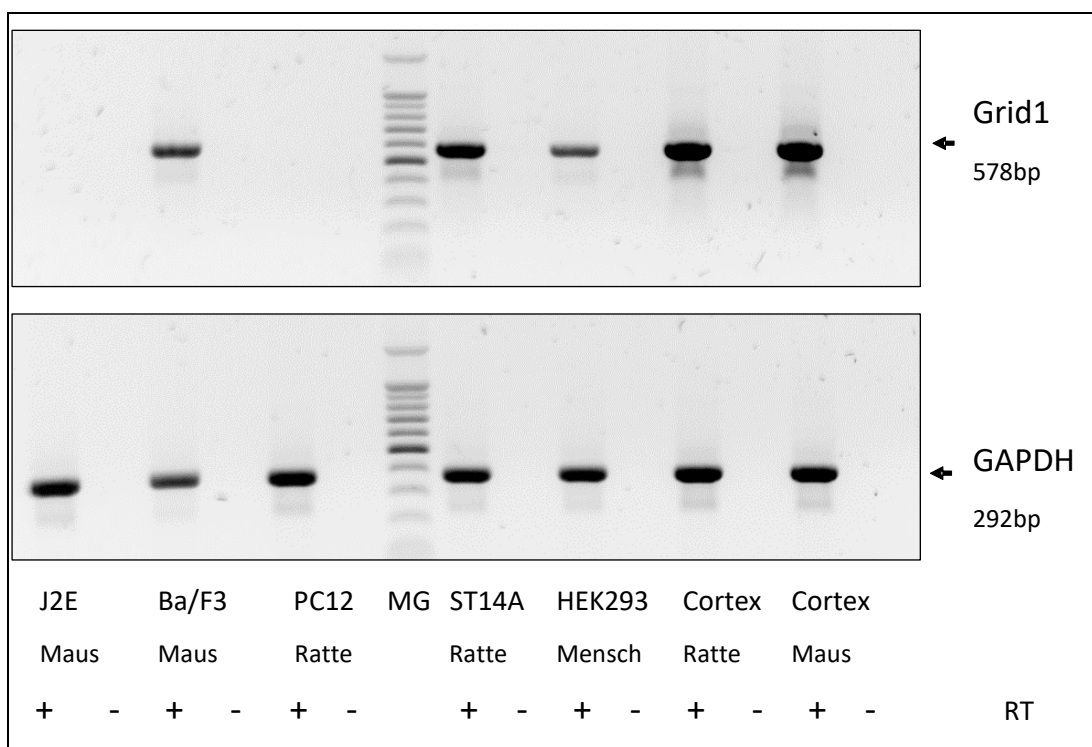


Abbildung 10 Expression von Grid1 in Zelllinien und Geweben verschiedener Spezies

Für die Analyse der ligandabhängigen Induktion von Grid1 wurde die Zelllinie HEK293 ausgewählt. Von dieser humanen Zelllinie lagen neben den parental Zellen Zellklone vor, die den Ratten-Erythropoetin-Rezeptor bzw. einen Hybridrezeptor aus

dem Humanen EGF-Rezeptor und dem Erythropoetin-Rezeptor stabil exprimieren und durch EPO bzw. EGF stimulierbar sind. Nach der Stimulation durch Cytokine wurde RNA isoliert und daraus generierte cDNA mittels PCR auf Veränderungen in der Expression von Grid1 untersucht. In Abbildung 11 wird ersichtlich, dass die Aktivierung beider Rezeptortypen schon nach ca. 30 Minuten zu einer Induktion des Grid1-Gens führt, während in den parentalen HEK293-Zellen eine schwache konstitutive Expression zu verzeichnen ist. Zu Kontrollzwecken wurde auch hier das housekeeping-Gen GAPDH analysiert.

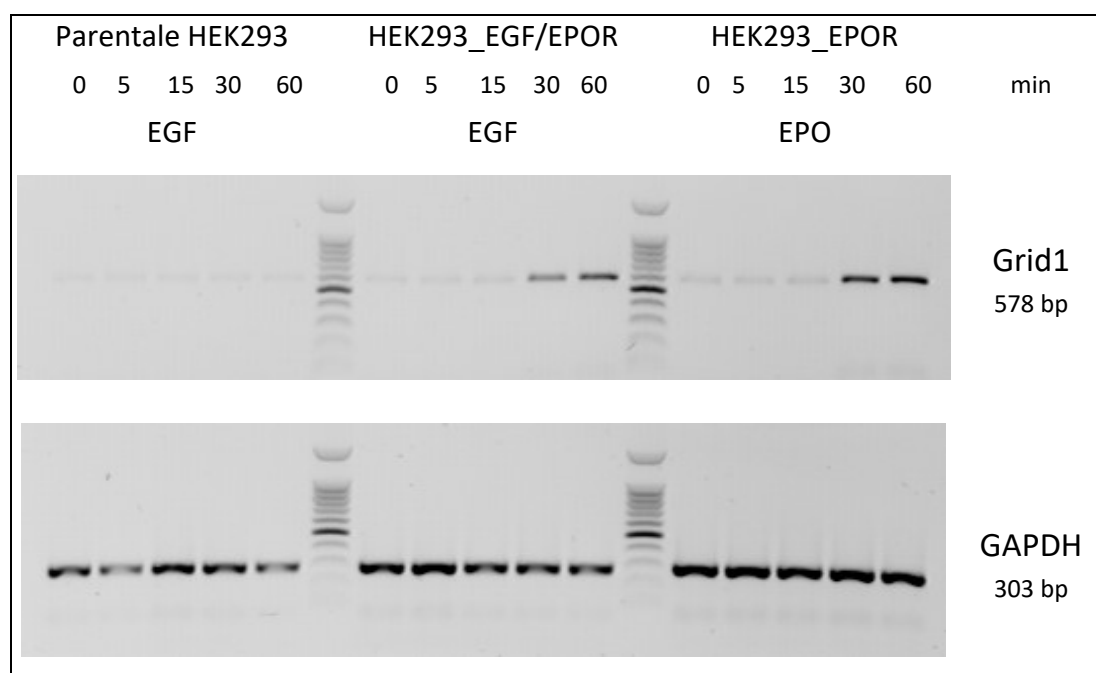


Abbildung 11 EPOR-abhängige Induktion von Grid1 in parentalen, EGF/EPOR- und rEPOR-HEK293-Zellklonen

5.1.2 Induktion von Grid1 durch Hypoxie in HEK293-Zellen

Das oben beschriebene Zellsystem wurde ebenfalls verwendet, um den Einfluss einer sinkenden Sauerstoffkonzentration auf die Expression des Grid1-Gens zu untersuchen. Dazu wurden Zellen in einem speziellen Brutschrank für 12 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und anschließend RNA isoliert. Die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bereits nach vier Stunden ein Anstieg der Grid1-Expression nachweisbar ist.

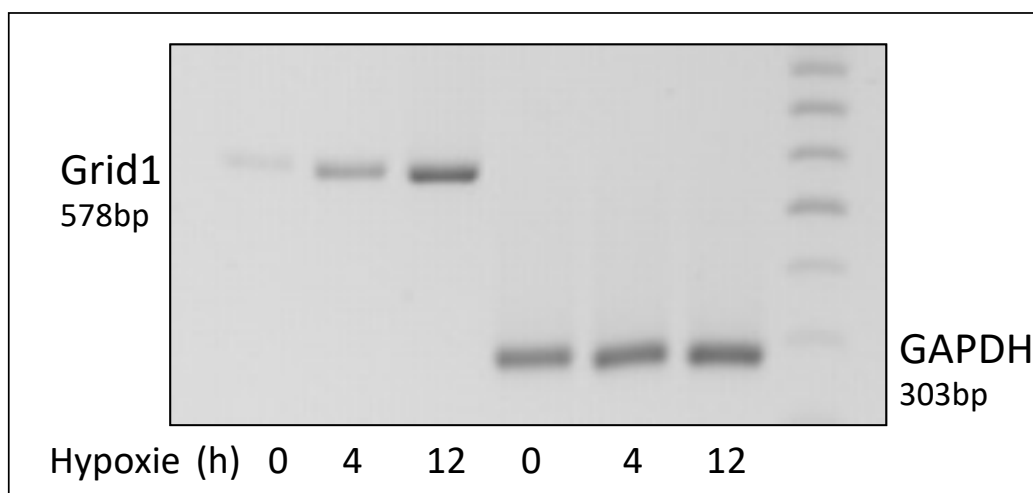


Abbildung 12 Hypoxie-abhängige Induktion von Grid1 in HEK293-Zellen

5.2 Analyse der Grid1-Induktion auf Transkriptionsebene

5.2.1 Klonierung des Grid1-Promotors der Ratte aus genomischer DNA

Um die im Abschnitt 5.1. beschriebene Induktion des Grid1-Gens durch EPO näher zu charakterisieren, wurde die Klonierung von regulatorischen Abschnitten des Gens im 5'-Bereich der kodierenden Sequenz aus genomischer DNA angestrebt. Dazu wurde genomische DNA aus Rattenblut extrahiert und als Zielmolekül für die Amplifikation relevanter Sequenzen verwendet. Bei der Analyse von Datenbanken wurde deutlich, dass die Sequenz im 5'-Bereich des Grid1-Gens bei der Ratte nur teilweise bekannt ist. Insbesondere fehlte bei den zugänglichen Datenbankeinträgen ein Sequenzabschnitt unbekannter Größe oberhalb des kodierenden Bereichs (siehe Abbildung 13).

Um den Promotorbereich zu amplifizieren, wurden mit dem Programm „Primerblast“ verschiedene PCR-Primer abgeleitet, die einerseits im kodierenden 5'-Bereich des Grid1-Gens positioniert wurden und andererseits die unbekannte Sequenz im regulatorischen Bereich flankierten.

Wie aus Abbildung 13 deutlich wird, wurden zwei sich überlappende Fragmente der Promotorregion amplifiziert, von denen Fragment 1 eine bisher in den Datenbanken nicht vorhandene Teilsequenz enthält. Nach Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1-TOPO wurden beide Fragmente sequenziert. Für das Fragment 1 ergab sich nach der Sequenzanalyse ein Insert von 226 Basenpaaren im Bereich der bis dahin unbekannten Struktur (siehe 8.1). Zur weiteren Verwendung wurden beide Fragmente

unter Nutzung einer im überlappenden Bereich lokalisierten Restriktionsschnittstelle (AflII) ligiert und in Reportergenvektoren subkloniert.

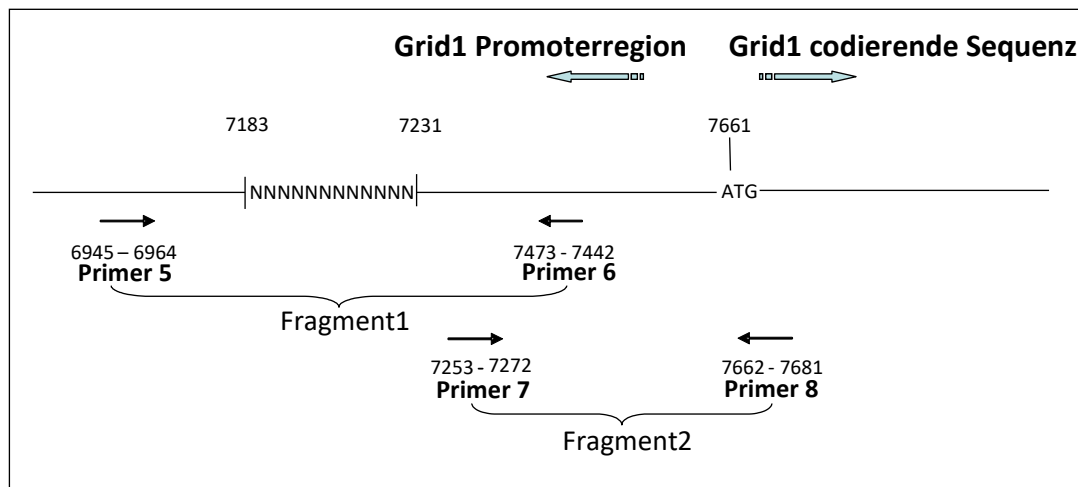


Abbildung 13 Schematische Darstellung der genomischen Organisation der Promotorregion des Grid1-Gens: angegeben sind die Positionen der PCR-Primer, des Startcodons und der Lokalisation der bisher in Datenbanken nicht verfügbaren Sequenz

5.2.2 Herstellung von Reportergenkonstrukten

Um das regulatorische Potenzial der klonierten Sequenzen des Grid1-Gens zu analysieren, wurden die entsprechenden Abschnitte aus dem Vektor pCR2.1-TOPO (siehe 5.2.1) isoliert und in den Reportervektor pGL3-basic eingefügt. Zu diesem Zweck waren bereits die oben (Abbildung 13) genannten PCR-Primer während ihrer Synthese mit Restriktionsschnittstellen (KpnI bzw. XhoI) versehen worden. Diese Schnittstellen, sowie die bereits erwähnte AflII-Schnittstelle wurden genutzt, um die Fragmente gemeinsam in den pGL3-basic-Vektor zu ligieren (Abbildung 14). Der Vektor selbst enthält keine eucaryotischen Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, die Expression des Luciferasegens wird ausschließlich durch das Potential des inserierten Promotorfragments reguliert. Nach Herstellung des Konstruktes wurden *E. coli* transformiert, die Plasmid-DNA präpariert und durch Sequenzierung verifiziert.

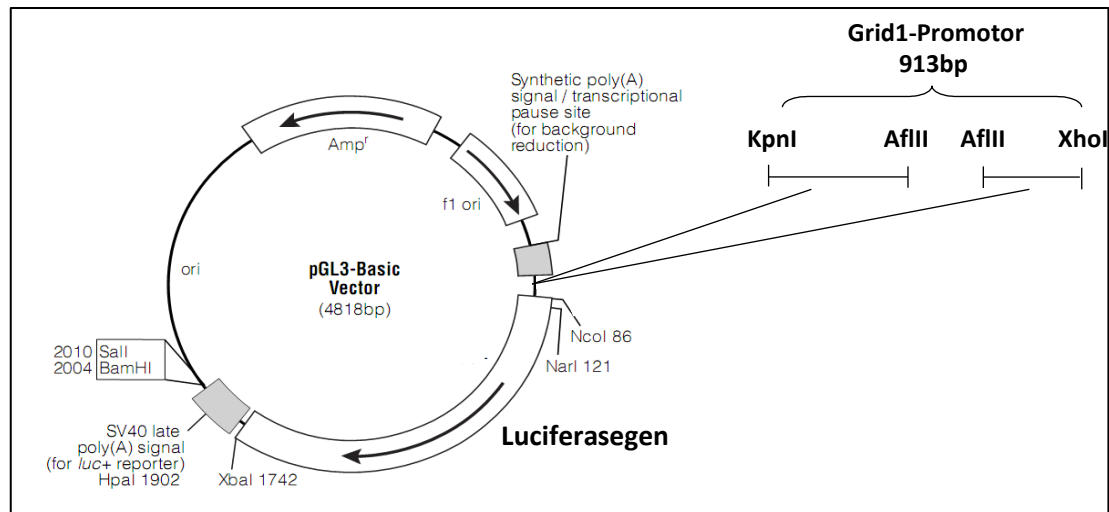


Abbildung 14 Herstellung eines Reportergenkonstruktes mit der putativen regulatorischen Sequenz des *Grid1*-Promotors (pGL3-913)

5.2.3 EPO-abhängige Induktion des *Grid1*-Promotors nach transienter Transfektion von Ba/F3-Zellen

Zur Analyse des *Grid1*-Promotors wurde ein Subklon der Pro-B-Zelllinie Ba/F3 verwendet. Die Zellen zeichnen sich durch eine stabile Überexpression des EPO-Rezeptors aus und werden deshalb häufig zur Untersuchung EPO-abhängiger Ereignisse eingesetzt. Nach vorübergehendem Wachstumsfaktorentzug und transienter Transfektion von Ba/F3-EPOR-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt pGL3-913 (Abbildung 14) wurden die Zellen mit IL-3 oder EPO stimuliert und nach jeweils vier Stunden die Aktivität des *Grid1*-Promotors in Reportergenassays bestimmt. Die Wirkung von IL-3 wurde hier vergleichend untersucht, da dieser Faktor essentiell für das Wachstum der Zellen ist und ähnliche Signalereignisse auslöst wie EPO. Beide Cytokine zeigen eine deutliche Induktion des *Grid1*-Promotors (Abbildung 15). Um unspezifische Ereignisse auszuschließen, wurden parallel auch Transfektionen mit dem Leervektor ausgeführt, bei denen keine Induktion nachweisbar war.

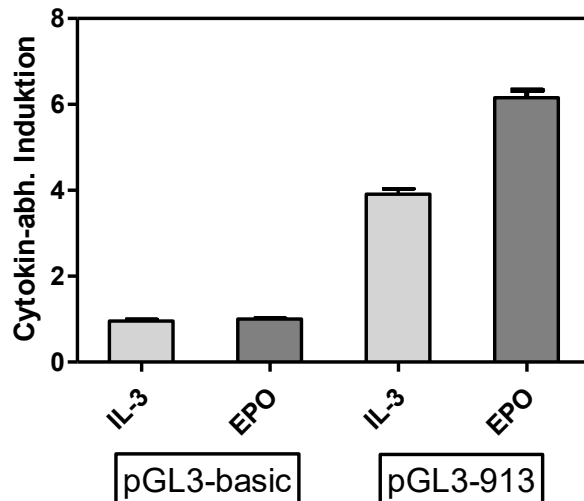


Abbildung 15 Cytokinabhängige Induktion von Reportergenkonstrukten nach transienter Transfektion von Ba/F3_EPOR-Zellen

Weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen EPO-Mengen zeigen eine klare Dosisabhängigkeit der Promotorinduktion (Abbildung 16). Die verwendeten EPO-Dosen liegen in einem Bereich, der beim Menschen physiologisch ist. In den folgenden Experimenten wurde eine EPO-Konzentration von 10 U/ml gewählt.

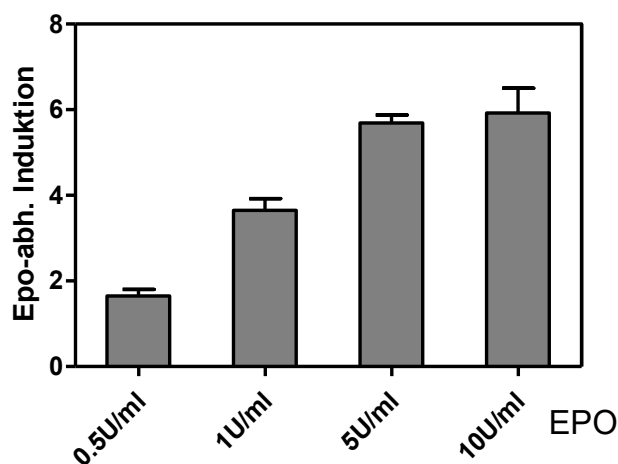


Abbildung 16 Konzentrationsabhängige Stimulation des Grid1-Promotors durch EPO

5.2.4 Analyse von an der Grid1- Induktion beteiligten Signalwegen

Zur weiteren Aufklärung der EPO-abhängigen Induktion des Grid1-Promotors wurden Reportergenassays durchgeführt, in denen sowohl im EPO-Signaltransfer funktionell involvierte Kinasen transient überexprimiert, als auch Signalweg-spezifische Inhibitoren eingesetzt wurden.

5.2.4.1 Einfluss der Überexpression von Tyrosinkinasen (JAK2, Lyn)

Um den Effekt der an der Genaktivierung durch EPO beteiligten Proteinkinasen JAK2 und Lyn auf die Induktion des Grid1-Promotors abzuklären, wurden Kotransfektionen mit Wildtyp cDNA (WT_JAK2, bzw. WT_Lyn) und dominant negativen Mutanten (DN_JAK2, bzw. DN_Lyn) durchgeführt. Die Überexpression des entsprechenden Proteins führt potentiell zu einer Verstärkung oder Abschwächung des EPO-abhängigen Signals und damit der Promotoraktivität. Die vorliegenden Ergebnisse (Abbildung 17) sprechen klar für eine Beteiligung der JAK2-Tyrosinkinase. Im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit einem Leerplasmid (pcDNA3.1) ist mit der Wildtyp-cDNA eine Zunahme der Induktion, mit dem dominant negativen Konstrukt jedoch eine deutliche Abnahme der Promotoraktivität zu sehen.

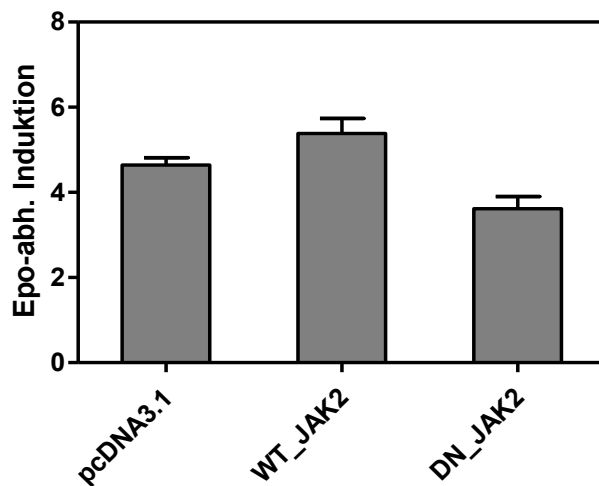


Abbildung 17 Einfluss der Überexpression von JAK2-cDNA-Konstrukten auf die EPO-abhängige Induktion des Grid1-Promotors

Daneben wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, den Einfluss der Lyn-Proteinkinase-abhängigen Signalwege auf die Induktion des Grid1-Promotors zu zeigen. Auch dabei konnte eine Verstärkung durch die Wildtyp-cDNA und eine Abschwächung durch das dominant negative Konstrukt gefunden werden (Abbildung 18), sodass ebenfalls von einer Beteiligung der Lyn-Proteinkinase auszugehen ist.

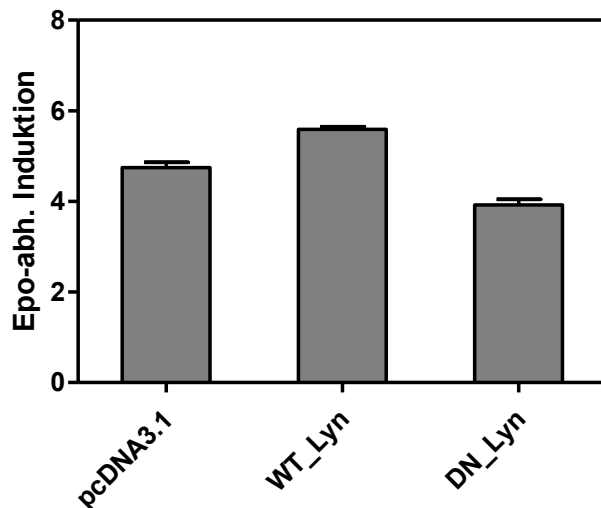


Abbildung 18 Einfluss der Überexpression von Lyn-cDNA-Konstrukten auf die EPO-abhängige Induktion des Grid1-Promotors

5.2.4.2 Einfluss von signalwegspezifischen Inhibitoren auf die EPO-abhängige Grid1-Promotoraktivierung

Zur Bestätigung der Kotretransfektionsergebnisse und zur Analyse der distal beteiligten Signalwege wurden signalwegspezifische Inhibitoren eingesetzt.

Unter Zugabe von spezifischen Inhibitoren von Proteinkinasen ist potentiell eine Abschwächung des EPO-abhängigen Signals zu erwarten. Bei einer Beteiligung des jeweiligen Signalweges zeigt sich eine verringerte Promotoraktivierung.

Bei dem eingesetzten Inhibitor für JAK2 AG-490 war eine dosisabhängige Reduktion der Promotoraktivierung nachweisbar (Abbildung 19), JAK2 ist somit eine wesentlich an der Induktion von Grid1 beteiligte Proteinkinase.

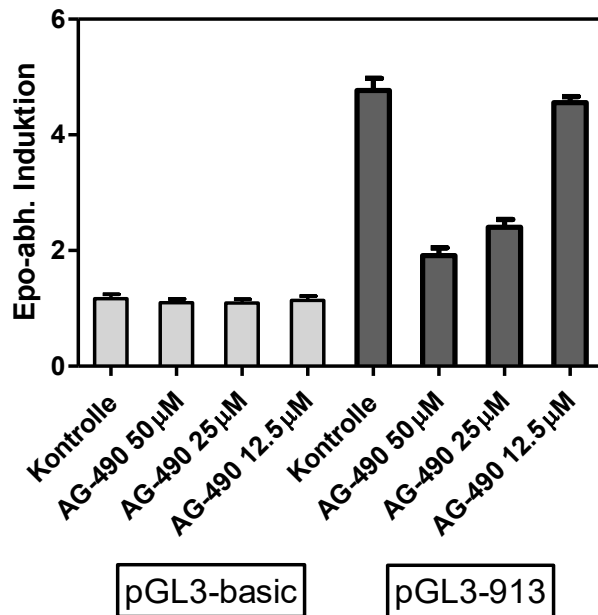


Abbildung 19 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den JAK2-Inhibitor AG-490

Für den MAP-Kinase-Signalweg spezifische Inhibitoren (MEK1/2: PD 98059, und p38-MAP-Kinase: SB203580) lösen jeweils eine dosisabhängige Reduktion der Promotoraktivierung aus (Abbildung 20, Abbildung 21). Dabei zeigen sich bei Einsatz des MEK1/2-Inhibitors ausgeprägte Effekte, welche gerade in hohen Konzentrationen (50 µM) auch aufgrund der allgemeinen Suppression des zellulären Stoffwechsels zu Stande kommen (vergleiche pGL3-basic PD98059 50 µM in Abbildung 20). Bei mittleren Konzentrationen des Inhibitors ist jedoch keine Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels feststellbar, aber eine anhaltende Abschwächung der EPO-abhängigen Induktion des Grid1-Promotors (vergleiche PD98059 10 µM bei pGL3-basic und pGL3-913 in Abbildung 20).

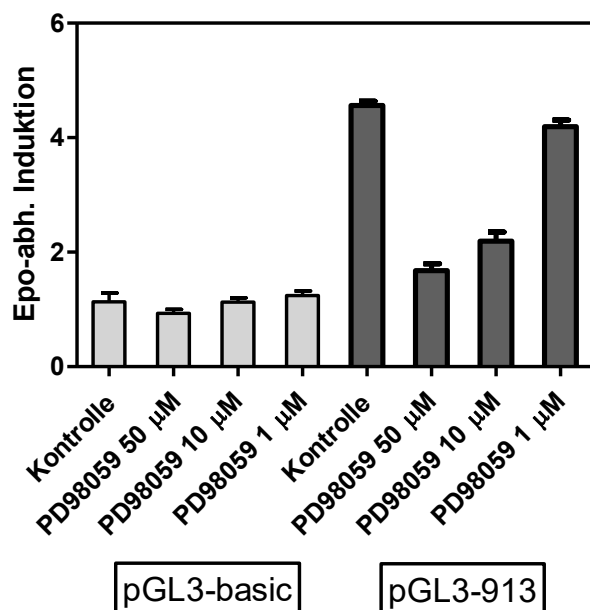


Abbildung 20 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den MEK1/2-Inhibitor PD 98059

Bei Verwendung des p38-MAP-Kinase-Inhibitors SB203580 (Abbildung 21) zeigt sich auch bei hohen Konzentrationen kein Einfluss auf den zellulären Stoffwechsel (vergleiche pGL3-basic SB203580 1 μ M Abbildung 21), und ein im Vergleich zum MEK1/2-Inhibitor PD 98059 geringerer Einfluss auf die EPO-abhängige Grid1-Induktion. Somit lässt sich vermuten, dass der raf-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg stärker an der EPO-abhängigen Grid1-Induktion beteiligt ist als der p38-MAP-Kinase-Signalweg.

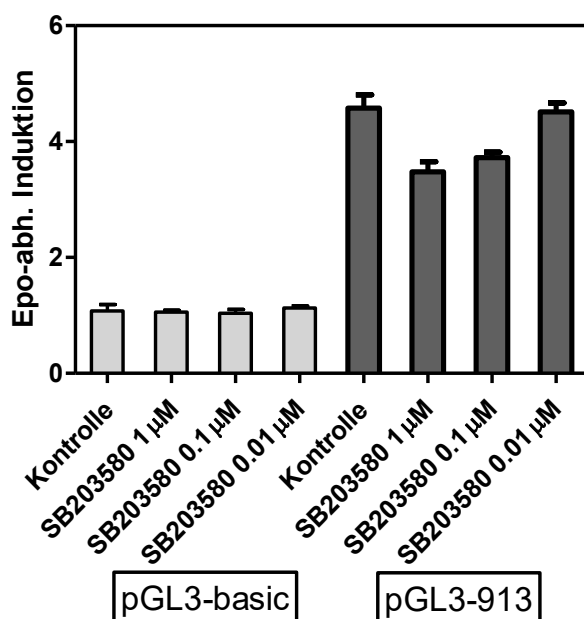


Abbildung 21 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den p38-MAPKinase-Inhibitor SB203580

Ebenso konnte bei dem PI3-Kinase Inhibitor Ly294002 eine Hemmung der Promotoraktivierung festgestellt werden (Abbildung 22). Die Hemmung der PI3K als proximaler Teil weiterer Signalkaskaden geht auch mit einer deutlichen Hemmung der EPO-abhängigen Grid1-Induktion einher. Schlussfolgernd ist von einer Beteiligung an der PI3K an der Grid1-Promotor-Induktion auszugehen.

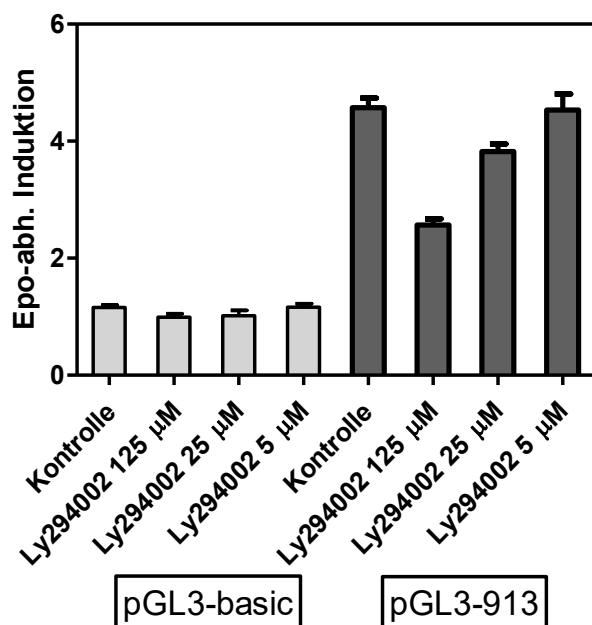


Abbildung 22 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002

Die Untersuchung zum Einfluss der Proteinkinase A (PKA) mittels PKA-Inhibitors H-89 bewies einen eher untergeordneten Effekt der PKA in der EPO-abhängigen Grid1-Promotoraktivierung (Abbildung 23).

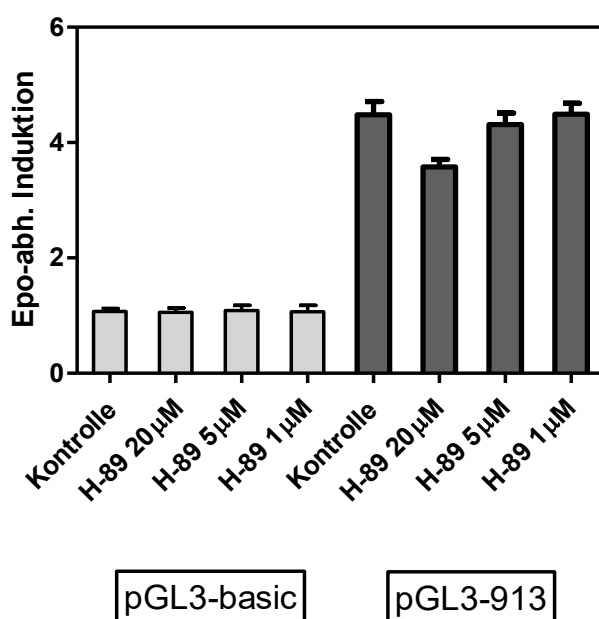


Abbildung 23 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den PKA-Inhibitor H-89

5.3 Regulation der GluD1-Phosphorylierung durch EPO

5.3.1 Klonierung und Überexpression der Grid1-cDNA

Für die Analyse der Folgen einer Überexpression von Grid1 ist die Klonierung der entsprechenden cDNA eine Grundvoraussetzung. Dazu wurde zunächst aus dem Cortex einer Ratte RNA präpariert und in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurden dann durch PCR zwei Teilsequenzen (Fragment1: 2028 bp; Fragment2: 1211 bp) amplifiziert, die zusammen den kompletten kodierenden Bereich des Grid1-Gens abdecken (siehe Abbildung 24). Für die spätere Klonierung der Fragmente in einen Expressionsvektor wurden an die Primer 1 und 4 bei der Synthese kurze Sequenzen angefügt, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme KpnI bzw. XhoI enthielten. Zunächst wurden die beiden PCR-Produkte jedoch in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und durch Sequenzierung verifiziert.

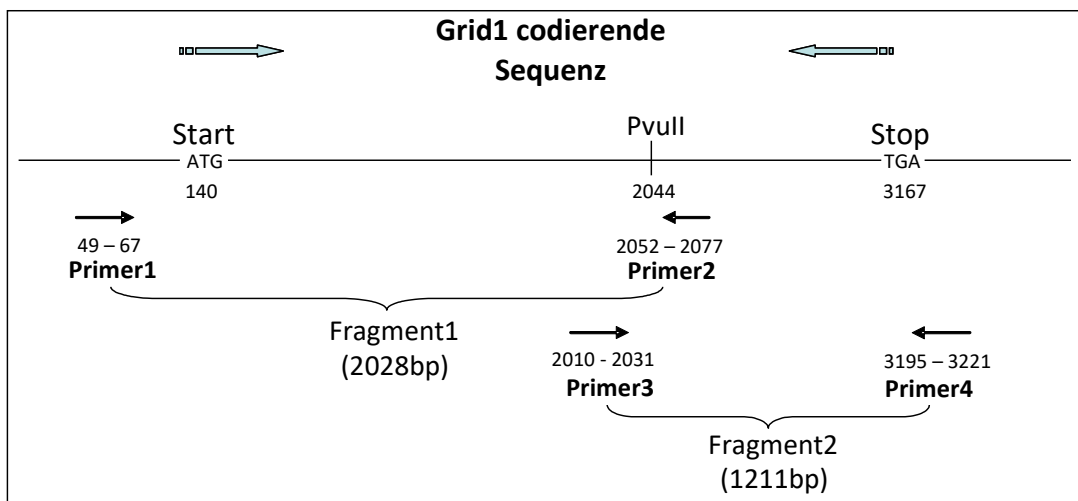


Abbildung 24 Amplifikation der kodierenden Sequenz des Grid1-Gens aus cDNA durch PCR

Anschließend wurden die beiden Fragmente durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen KpnI/PvuII bzw. PvuII/XhoI präpariert und gemeinsam in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ligiert (Abbildung 25). Das resultierende Plasmid pcDNA3.1(+)-Grid1 wurde durch Sequenzierung überprüft und anschließend für Transfektionsexperimente eingesetzt.

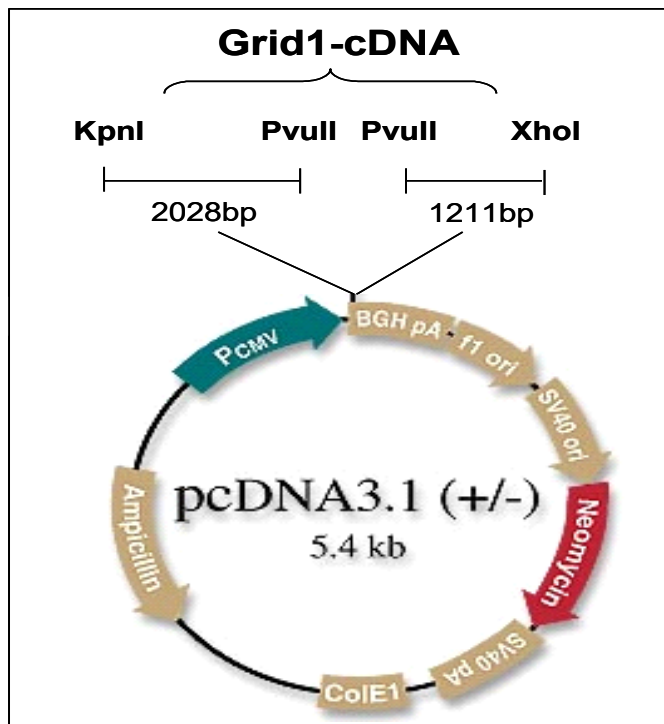


Abbildung 25 Herstellung eines Expressionsplasmids zur Überexpression von Grid1

Die Funktion des Konstrukts wurde geprüft, indem das Plasmid durch Elektroporation in HEK293_rEPOR-Zellen eingebracht und die Expression des GluD1-Proteins in Zelllysaten durch Immunoblots nachgewiesen wurde. In Abbildung 26 wird deutlich, dass in transfizierten Zellen das GluD1-Protein mit einem spezifischen Antikörper nachweisbar ist. Als Positivkontrolle wurde ein Proteinlysate aus dem Cortex der Ratte verwendet, als Negativkontrolle dienten COS-Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3.1(+) transfiziert waren.

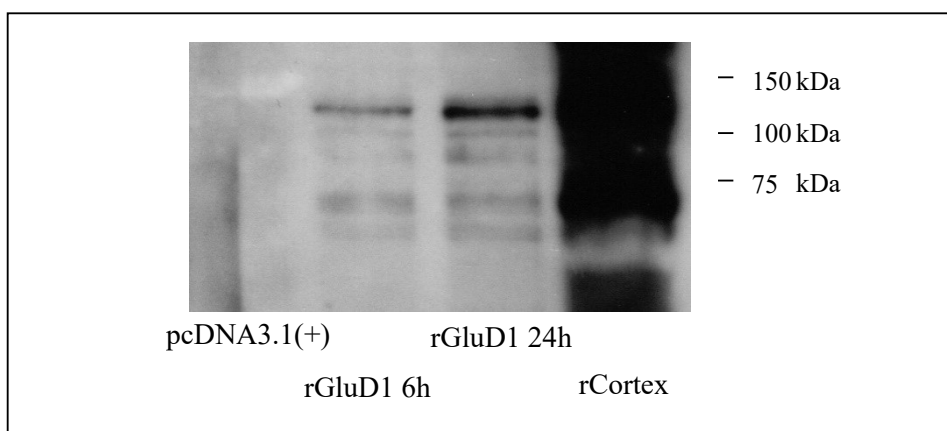


Abbildung 26 Transiente Expression von rGluD1 in HEK293_rEPOR-Zellen

5.3.2 EPO-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung des GluD1-Proteins nach Überexpression

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass 24 Stunden nach Transfektion von HEK293_rEPOR-Zellen mit dem pcDNA3.1(+)-rGrid1-Konstrukt eine deutliche Expression des rGluD1-Proteins nachweisbar ist. Die verwendeten Zellen zeichnen sich durch eine stabile Expression des Ratten-EPO-Rezeptors aus. Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass der Rezeptor nach Stimulation mit EPO entsprechende Signale generiert. Nach Gewinnung von Immunpräzipitaten aus EPO-stimulierten bzw. unstimulierten Zellen konnte durch einen Immunoblot gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung des GluD1-Proteins EPO-abhängig verstärkt wird (Abbildung 27). Um eine ungleichmäßige Beladung auszuschließen wurde die Membran danach mit einem GluD1-Antikörper untersucht (Abbildung 27: unterer Teil).

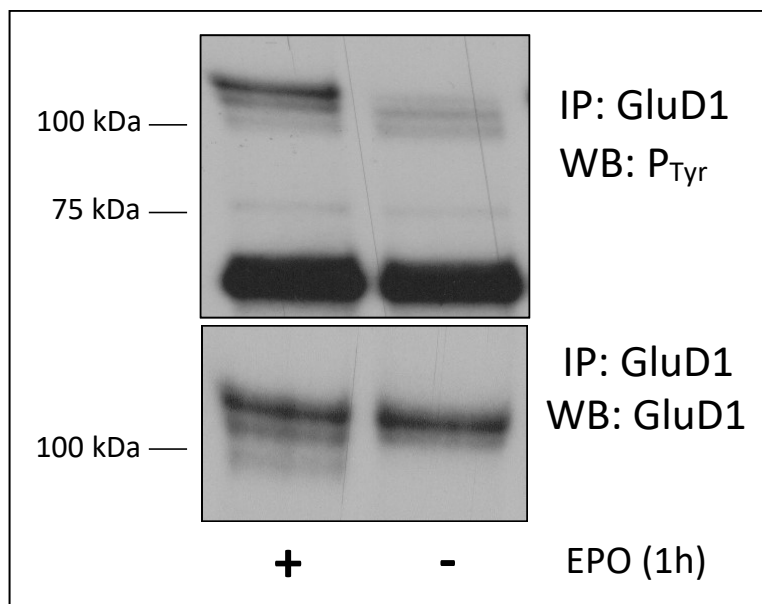


Abbildung 27 GluD1 wird nach EPO-Stimulation an Tyrosinresten phosphoryliert

5.4 Physische Assoziation von GluD1 mit ionotropen Glutamatrezeptoren

Eine Assoziation des GluD1-Proteins mit anderen ionotropen Ionenkanälen ist noch weitgehend unklar. Es wurde deshalb versucht, durch Koimmunopräzipitationsexperimente Informationen über mögliche Bindungspartner zu gewinnen. Die Versuche wurden mit ST14A-Zellen, einer Zelllinie mit

Eigenschaften neuraler Vorläuferzellen, durchgeführt. Diese Zellen zeigen eine schwache endogene Expression des EPO-Rezeptors. Die hier gezeigten Daten wurden mit einem Subklon (ST14A_rEPOR) erarbeitet, der nach Transfektion mit einer cDNA für den Ratten-EPOR eine Überexpression des Proteins im Vergleich zu den parentalen Zellen zeigt (Abbildung 28a und b).

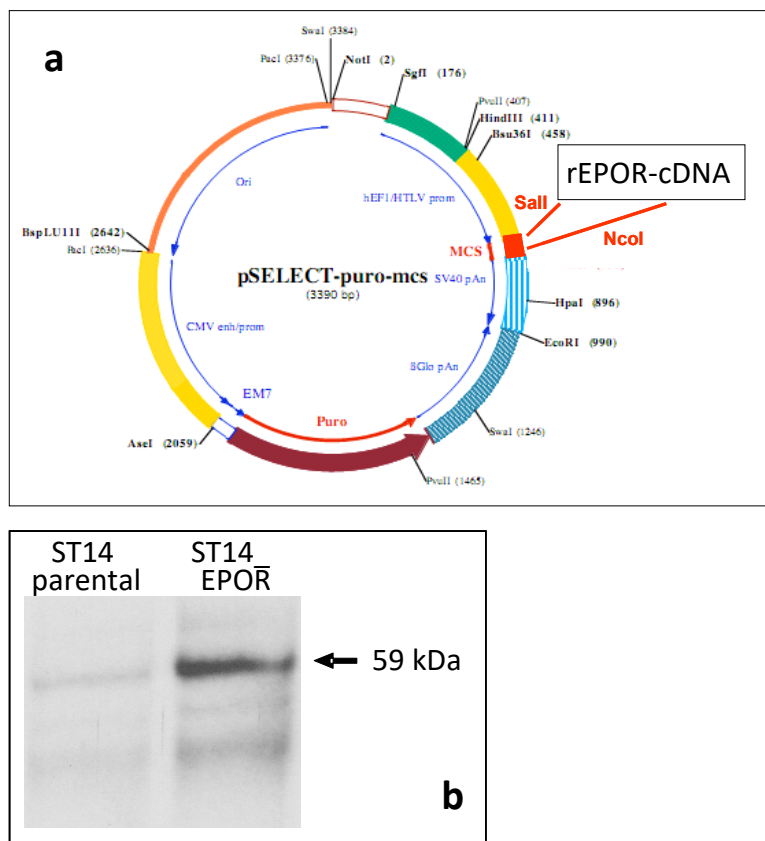


Abbildung 28 Die cDNA für den Ratten-EPOR wurde in den Expressionsvektor pSelect-puro-mcs kloniert (a) und nach Elektroporation und Puromycinselektion stabil in ST14A-Zellen exprimiert (b).

Für den Nachweis koprizipitierter Proteine wurden aus EPO-stimulierten Zellen bzw. Kontrollzellen Immunpräzipitate mit einem GluD1-Antikörper hergestellt und durch Immunoblotting analysiert (Abbildung 29). Dabei wurde zunächst gezeigt, dass das GluD1-Protein erfolgreich präzipitiert werden konnte (Abbildung 29 oberer Teil).

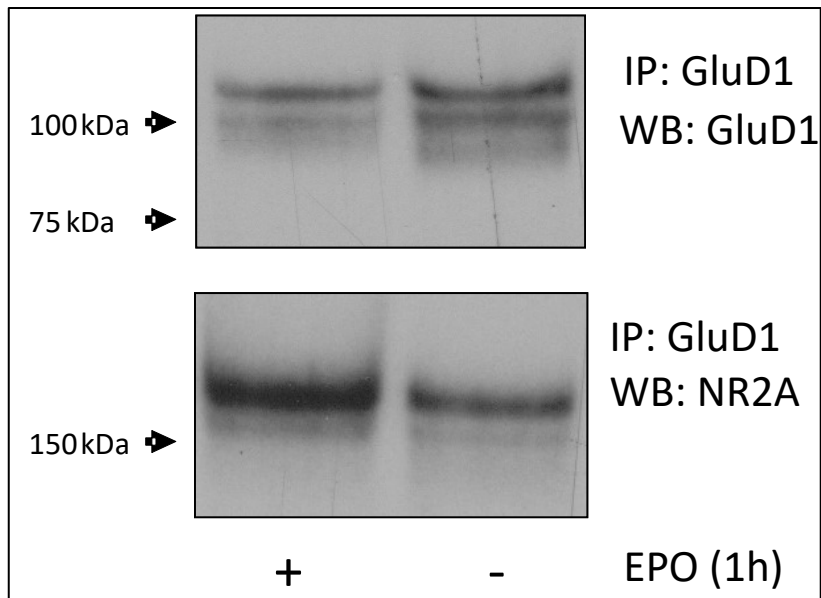


Abbildung 29 Der ionotrope Glutamatrezeptor NR2A ist in GluD1-Immunpräzipitaten nachweisbar (IP: Immunpräzipitation, WB: Western Blot)

Ein anschließender Western Blot mit einem für die Rezeptoruntereinheit NR2A spezifischen Antikörper macht eine Kopräzipitation dieses Proteins mit GluD1 deutlich und zeigt darüber hinaus eine zunehmende Präsenz von NR2A nach EPO-Stimulation (Abbildung 29 unterer Teil).

6 Diskussion

Grid1 wird EPO-abhängig induziert

Erythropoetin hat multiple Effekte auf Zellen des Zentralnervensystems (Abschnitt 2.3), die bisher nur zum Teil molekular erklärbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von EPO auf die Regulation von Grid1, ein funktionell im ZNS lokalisiertes Zielgen, untersucht. Die bereits aus publizierten Daten der Arbeitsgruppe bekannte EPO-abhängige Induktion von Grid1-mRNA in murinen Ba/F3-Zellen (Büchse et al. 2006) konnte in dieser Arbeit reproduziert werden.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass dieses Phänomen nicht nur in murinen Zellen, sondern auch in humanen Zellen (HEK293) zu beobachten ist. Grid1 wird allerdings keinesfalls ubiquitär exprimiert und ist auch nicht in allen Zellen mit neuronaler Charakteristik nachweisbar.

In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise auf eine EPO-abhängige Regulation der Grid-Gene. Während Grid2 in CD34⁺-erythroiden Progenitorzellen (Sivertsen et al., (2006) und oligodendrozytären Vorläuferzellen (Gyetvai et al. 2017) durch EPO induziert wird, bleibt die Grid1-Expression konstant.

Eine Untersuchung der Geninduktion durch carbamylisiertes EPO (CEPO, ein nicht-hämatopoetisches Erythropoetin-Derivat) in neuronalen Zellen (PC-12) mit Hilfe von Microarrays (Tiwari et al. (2019) zeigt ebenfalls einen Einfluss auf die Grid2-Expression.

Hypoxie verstärkt die Grid1-Expression

Auch durch Hypoxie konnte eine Induktion des Grid1-Gens hervorgerufen werden. Sehr wahrscheinlich wird im verwendeten Zellmodell durch Hypoxie EPO gebildet, welches dann autokrin den EPOR stimuliert. Die zeitliche Verzögerung im Vergleich zur direkten Stimulation mit EPO spricht für diese Hypothese. Die verwendeten HEK293-Zellen wurden von verschiedenen Autoren als Modell für das Studium EPO-abhängiger oder hypoxischer Effekte benutzt (Salah-Hussiesy et al. 2018; Song et al.

2015; Miller et al. 2015; Hsu et al. 2013; Chattong et al. 2013; Volbracht et al. 2009; Kirkeby et al. 2007; Zhao et al. 2007; Montoye et al. 2005).

Im ZNS ist in verschiedenen Spezies eine auto-/parakrine Sekretion von EPO beschrieben worden (Dame et al. 2001). Die nachweisbare EPO-Konzentration im menschlichen ZNS wird unter physiologischen Gegebenheiten am ehesten durch lokale Produktion, also Produktion im ZNS selbst, erklärt.

In mehreren Untersuchungen konnte bei intakter Blut-Hirn-Schranke keine Korrelation der Konzentration von Serum-EPO mit Liquor-EPO gefunden werden (Juul et al. 1997; Marti et al. 1997). Jedoch korreliert die Liquor-EPO-Konzentration mit dem Ausmaß einer Schrankenfunktionstörung (Marti et al. 1997). Bei intakter Blut-Hirn-Schranke konnte ebenfalls kein Anstieg der Liquor-EPO-Konzentration nach rhEPO-Gabe nachgewiesen werden (Buemi et al. 2000; Juul et al. 1999a). In den genannten Arbeiten wurde aber andererseits wiederholt betont, dass gerade bei generalisierter Hypoxie oder fokalen Minderversorgungen des Gehirns (z. B. bei Blutungen oder ZNS-Trauma) eine Erhöhung der Liquor-EPO-Konzentrationen festgestellt werden kann, sodass daraus eine autochthone, hypoxieinduzierte EPO-Produktion des Gehirns abgeleitet werden kann.

Unter experimentellen Bedingungen konnte eine Produktion von EPO durch Astrozyten nachgewiesen werden (Masuda et al. 1994; Masuda et al. 1997). Dabei zeigte das durch Astrozyten produzierte EPO eine höhere biologische Aktivität als das aus Serum gewonnene (Masuda et al. 1994).

In einer aktuellen Arbeit von Calvo-Anguiano et al. (2018) wurden Genexpressionprofile in zwei verschiedenen Hypoxiemodellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine Induktion der Gene für EPO und HIF1 α (Trans-aktivierendes Protein der EPO-Genexpression) in beiden Hypoxiemodellen.

Dai et al. (2017) vermuten, dass HIF-1 α - induzierte Genprodukte (z. B. VEGF, IGF-1 und EPO) neuroprotektive Mechanismen fördern, und fanden eine vermehrte GluR2-Expression nach Verabreichung dieser Wachstumsfaktoren. GluR2 ist essentiell für das neuronale Überleben, verminderte GluR2 Expression führt zu neuronaler Toxizität (Umeda et al. 2016). Die Expression des GluD1-Proteins wurde in der vorliegenden Arbeit nicht explizit untersucht.

Wie bereits erwähnt, werden durch Hypoxie, den Schlüsselreiz der EPO-Bildung, neuroprotektive Mechanismen induziert. Die Vermutung liegt nahe, dass EPO selbst, zumindest zum Teil, funktionell in die Aktivierung dieser Mechanismen involviert ist.

Zahlreiche Arbeiten zeigen, dass EPO oder nicht-hämatopoetische EPO-Derivate neuroprotektive Effekte in verschiedenen klinischen und experimentellen Szenarien vermitteln. Dazu zählen:

- Hypoxie/Ischämie-Modelle (Sakanaka et al. 1998; Bernaudin et al. 1999; Sirén et al. 2001; Juul 2002; Yamasaki et al. 2005; Byts und Siren 2009; Xu et al. 2009; McPherson und Juul 2010; Hsu et al. 2013; Juul und Pet 2015; Li et al. 2017a; Mallet und Ryou 2017; Yoo et al. 2017; Bircher und Dukhovny 2018; Fernando et al. 2018; Juul et al. 2018; Ma et al. 2018; Oshima et al. 2018; Robinson et al. 2018; Yamanaka et al. 2018),
- traumatische Schäden (Gantner et al. 2018; Hellewell et al. 2018; Hong et al. 2018),
- oxidativer Stress (Castillo et al. 2018; Eisenga et al. 2018)
- die Reduktion von Hirnödemen bei traumatischen ZNS-Schäden (Gunnarson et al. 2009; Blixt et al. 2018).

Darüberhinaus wurden EPO-Effekte auf neuro-psychiatrische Störungen untersucht. Erste *in vitro* und *in vivo* Studien zeigen einen möglichen positiven Effekt auf den zerebralen Energiestoffwechsel bei Multipler Sklerose (Singhal et al. 2018), sowie anxiolytische und pro-kognitive Eigenschaften in Tiermodellen (Bonnas et al. 2017). Daneben wurden wiederholt positive Effekte auf die kognitiven Defizite bei Depressionen und bipolare Störungen beschrieben (Miskowiak et al. 2010; Miskowiak et al. 2014a; Miskowiak et al. 2014b; Li et al. 2017b).

Keine Effekte auf die Psychopathologie, aber einen positiven kognitiven Effekt bei Patienten mit einer Schizophrenie beschreiben Ehrenreich et al. 2007. Kastner et al. 2012 zeigen eine vom EPO- und EPOR-Genotyp abhängige höhere kognitive Leistung bei schizophrenen und gesunden Probanden, und vermuten somit eine Beeinflussung von kognitiven Defiziten bei Hirnerkrankungen durch EPO.

Dik et al. (2018) zeigten eine entgegengesetzte Wirkung von EPO in rechter und linker Hirnhälfte. Dabei verstärkt EPO die inhibitorische Neurotransmission im linken prälimbischen Kortex der Maus, und vermindert die inhibitorische Neurotransmission im rechten prälimbischen Kortex der Maus.

Vor dem Hintergrund anderer Hypothesen wie z. B. der Genese von Depression aufgrund einer Unteraktivität im linken dorsolateralen präfrontalen Kortex (DLPFC)

(Baxter, JR et al. 1989) und der Wirksamkeit anderer Therapieverfahren (z. B. repetitive transkranielle Magnetstimulation, siehe z. B. Schutter 2009), welche „harmonisierend“ auf neuronale Netzwerke wirken, könnte dies auch ein möglicher Wirkansatz für EPO bei (neuro-) psychiatrischen Störungen sein.

Signalwege der EPO-abhängigen Grid1-Induktion

Die in der vorliegenden Arbeit für die Analyse der Grid1-Induktion verwendeten Ba/F3-EPOR-Zellen fanden bisher Anwendung in verschiedensten Untersuchungen zu EPO-abhängigen Signalwegen (Yan et al. 2012; Bulut et al. 2013; Heir et al. 2016) und wurden auch benutzt, um mathematische Erythropoese-Modelle zu erstellen (Klingmüller und Schilling 2017). Aus diesen Gründen wurden die Zellen auch für die hier beschriebenen Experimente eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde nach Klonierung des Grid1-Promotors die Beteiligung EPO-abhängiger Signalwege an der Aktivierung des Grid1-Gens durch Reporterassays untersucht. Dabei konnte durch den Einsatz signalwegspezifischer Inhibitoren die Beteiligung der aus dem hämatopoetischen System bekannten EPOR-Signalkaskaden (JAK2/STAT5, Lyn, MAP-Kinase, PI3-Kinase) an der Induktion von Grid1 nachgewiesen werden. Die bisher publizierten Daten zeigen, dass die analysierten Signalwege auch in EPO-sensitiven Zellen des ZNS eine dominierende Rolle spielen. Dies gilt vor allem für den MAPK/ERK-Signalweg (Koshimura et al. 1999; Lee et al. 2004; Kilic et al. 2005; Wang et al. 2008), und den JAK/STAT-Signalweg (Digicaylioglu und Lipton 2001; Kilic et al. 2005; Liu et al. 2005; Byts et al. 2008). Die Kotransfektionsexperimente mit Wildtyp- bzw. dominant negativen Signalmolekülen bestätigen diese Aussagen. Auch der PI3Kinase-Signalweg spielt bei der Aktivierung des Grid1-Gens offensichtlich eine maßgebliche Rolle, eine Tatsache, die aufgrund diverser Nachweise für seine EPO-regulierte Aktivität in Zellen unterschiedlichster Herkunft verständlich ist (Kilic et al. 2005; Zhang et al. 2006; Byts et al. 2008; Wang et al. 2008; Ma et al. 2018).

Eine eher geringe Beteiligung ist für PKA-abhängige Signale festzustellen. Dies steht aber im Einklang damit, dass die PKA auch in anderen EPO-regulierten Systemen nur eine untergeordnete Rolle spielt oder inaktiv bleibt (Boer et al. 2002).

Funktionelle Bedeutung von GluD1

Im Nachfolgenden soll die Funktion des GluD1-Proteins, einem im Gegensatz zu GluD2 funktionell noch wenig charakterisierten Genprodukt, besprochen werden.

Ionenkanalfunktion und Kolokalisation mit anderen Glutamatrezeptoren

Ähnlich wie bei GluD2 konnten für GluD1 bisher keine direkten Ionenkanalfunktionen nachgewiesen werden. Für eine eventuelle Komplexbildung mit anderen ionotropen Glutamatrezeptoren existieren widersprüchliche Ergebnisse.

Villmann et al. (1999) fanden nach Fusion der putativen Porendomäne von GluD1 mit verschiedenen anderen ionotropen Glutamatrezeptoren keine für einen funktionellen Ionenkanal sprechenden Effekte. Orth et al. (2013) hingegen konnten für einen chimären Kainat-GluD1-Rezeptor eine Ionenkanalfunktion experimentell nachweisen und Ähnlichkeiten hinsichtlich des Ionenflusses mit AMPA- und Kainat-Rezeptoren feststellen. Schon zuvor wurden durch Yadav et al. (2011), allerdings erst nach gezielter Manipulation der Transmembranregion 3 des GluD1-Rezeptors, Daten gewonnen, die Kanaleigenschaften wahrscheinlich machen.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Kopräzipitationsexperimente eine physische Interaktion von GluD1 und der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2A in ST14A-Zellen gezeigt werden. Ein solcher Nachweis läßt sich in der Literatur bisher nur für GluD2 finden. Wie bereits oben ausgeführt, gibt es Hinweise, dass in der Säugetier-Retina delta-Untereinheiten mit Kainat-Rezeptoren assoziiert vorliegen (Ghosh et al. 2001), für verschiedene Hirnareale oder in Zellkulturen sind bisher keine Assoziationen von GluD1 mit anderen ionotropen Glutamatrezeptoruntereinheiten in der aktuellen Literatur publiziert. Bereits 1997 konnten Landsend et al. zumindest eine Kolokalisation von GluD2 und den AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR2/3 in den Dendriten von Purkinje-Zellen zeigen. Die Autoren vermuten, dass diese Anordnung eine direkte Interaktion zwischen den beiden Rezeptorklassen ermöglichen könnte.

Eine immunzytochemische Kolokalisation von delta-Untereinheiten und dem metabotropen mGluR1 fanden Petralia et al. (1996) im dorsalen Nucleus cochlearis an postsynaptischen Verdickungen bestimmter Zellschichten. Elektronenmikroskopisch konnte die Kolokalisation an den gleichen postsynaptischen Verdickungen bestätigt werden, was jedoch nicht automatisch bedeutet, dass die delta-Untereinheiten einen

funktionellen Komplex mit mGluR1 bilden. Darüberhinaus konnten in der genannten Arbeit delta-Untereinheiten an Gliazellen nachgewiesen werden. Eine weitere Kolo-kalisation eines metabotropen Glutamatrezeptors (mGluR5) mit GluD1 im Hippocampus konnten Suryavanshi et al. (2016) zeigen. Die Autoren vermuten, dass GluD1 für die physiologische Funktion von mGluR5 benötigt wird. Dies wird durch die Arbeit von Benamer et al. (2017) unterstützt und ein Bezug zur Entstehung von (neuro-) psychiatrischen Störungen mit dysfunktionaler dopaminerger Neurotransmission (z. B. Schizophrenie) durch GluD1-Mutationen hergestellt.

Die Autoren spekulieren, dass eine Kanalaktivität im Falle von GluD1 nicht durch einen (extrazellulären) Agonisten zustande kommt, sondern durch intrazelluläre Signalereignisse, wie sie z. B. durch metabotrope Glutamatrezeptoren induziert werden (aktuell vorrangig mGluR1/5 beschrieben). Insgesamt bleibt zur Zeit aber unklar, ob GluD1 einen funktionellen Agonisten und eine *in vivo* funktionierende Ionenkanalaktivität besitzt.

Posttranslationale Modifikation

In der vorliegenden Arbeit konnte in HEK293-Zellen nach transienter Überexpression von Grid1-cDNA eine EPO-abhängige Tyrosinphosphorylierung von GluD1 gezeigt werden. HEK293-Zellen wurden wiederholt als Modell für Untersuchungen an GluD1- und GluD2-Proteinen verwendet (Ly et al. 2002; Ryu et al. 2012; Yasumura et al. 2012; Ady et al. 2014; Konno et al. 2014; Benamer et al. 2017; Dadak et al. 2017). Die funktionelle Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikation von GluD1 lässt sich aktuell nicht klar einordnen, könnte aber wie bei anderen Proteinen der Konformationsänderung, Aktivierung (der Kanalaktivität) und/oder Schaffung von SH2-Domänen-Bindungsstellen für Protein-Protein-Interaktionen dienen. Vor dem Hintergrund der nachgewiesenen GluD1-Zytoskelettprotein-Interaktion (Hirai und Matsuda 1999; Hirai 2000; Ly et al. 2002; Stankewich et al. 2010) könnte eine Kinasen-abhängige Tyrosinphosphorylierung möglicherweise zur (schnellen) Regulation der GluD1-Präsentation an der Zelloberfläche dienen. In weiterführenden Untersuchungen wäre es sehr interessant zu klären, ob die EPO-induzierte Phosphorylierung von GluD1 möglicherweise für die Aktivierung der Kanalaktivität relevant ist. In einer kürzlich publizierten Arbeit von Dadak et al. (2017) wurde ein

entsprechender Zusammenhang für GluD2 gezeigt. Dort wird die intrinsische Kanalaktivität durch Beteiligung des PKC-Signalweges gesteuert.

Synapsenorganisation

Eine Reihe von Publikationen hat in der jüngeren Vergangenheit Hinweise darauf geliefert, dass GluD1 möglicherweise an der Synapsenorganisation beteiligt ist (Kuroyanagi et al. 2009; Ryu et al. 2012; Yasumura et al. 2012; Konno et al. 2014; Gupta et al. 2015; Livide et al. 2015). Einerseits sollen GluD1 und GluD2 als postsynaptische Moleküle einen dreiteiligen Komplex mit Cerebellinen und präsynaptischen Molekülen (Neurexine und *deleted-in-colorectal-cancer* (DCC)) bilden und für die Synapsenregulation zuständig sein (Matsuda et al. 2010; Stankewich et al. 2010; Siddiqui und Craig 2011; Ryu et al. 2012; Seigneur und Südhof 2017; Hoxha et al. 2018; Kakegawa und Yuzaki 2018). Am sichersten scheinen GluD2-Cerebellin-Neurexin-Trimere bei Parallel-Faser-Purkinje-Zell-Synapsen (Cerebellum) belegt zu sein (Hashimoto et al. 2001; Yuzaki 2009; Kuroyanagi und Hirano 2010; Uemura et al. 2010; Joo et al. 2011; Ito-Ishida et al. 2012; Yuzaki 2012; Cheng et al. 2016; Elegheert et al. 2016; Kotajima-Murakami et al. 2016; Zanjani et al. 2016; Good et al. 2017; Pendyala et al. 2017; Zhong et al. 2017; Rong et al. 2018). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass GluD1 bei der Bildung von inhibitorischen Synapsen beteiligt ist und eine Rolle in der Pathogenese des Rett-Syndroms spielt (Livide et al. 2015; Patriarchi et al. 2016). Die Autoren der genannten Artikel berichten von einer Grid1-Überexpression bei verschiedenen Formen des Rett-Syndroms und zeigen einen starken Zusammenhang von GluD1 mit der Bildung inhibitorischer Synapsen. Auch Stankewich et al. (2010) konnten bei betaIII-Spektrin-knock-out-Mäusen eine verminderte Expression von delta-Glutamatrezeptoren mit einer konsekutiv verminderten Synaptogenese feststellen. Im Hinblick auf die EPO-abhängige Induktion von Grid1 wäre daher die Vorstellung abzuleiten, dass eine vermehrte Grid1-Expression zu einer vermehrten Bildung von inhibitorischen Synapsen führt und somit infolge reduzierter Exzitotoxizität neuroprotektiv wirkt.

Zusammenfassende Überlegungen

In Zusammenschau der bisherigen Forschungsergebnisse und den durchgeführten Untersuchungen kann man feststellen, dass GluD1 potentiell eine Kanalaktivität besitzt, aber wahrscheinlich kein relevanter extrazellulärer Agonist existiert. Die Porenfunktion könnte durch intrazelluläre Mechanismen, z. B. Phosphorylierung, reguliert werden.

Denkbar wäre auch eine evolutionäre Veränderung der Ligandenbindungsdomäne weg vom Rezeptor hin zum postsynaptischen Bindungspartner eines synapsenstabilisierenden/-bildenden Komplexes. Gerade durch die Beteiligung an der Synaptogenese könnte durch eine EPO-abhängige Induktion von Grid1/GluD1 ein Teil der neuroprotektiven Effekte erklärt werden. Zu den antientzündlichen, antiapoptischen, vasculär/angiogenetischen und differenzierungsfördernden Effekten könnte EPO damit auch eine synaptogenetische Wirkung zugeschrieben werden. Unter diesem Blickwinkel wird auch der bereits diskutierte Zusammenhang zwischen Grid1-Mutationen und neuro-psychiatrischen Störungen besser erklärbar.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass das Grid1-Gen und das kodierte Protein GluD1 Zielmoleküle im EPO-Signaltransfer unterschiedlicher Spezies und Zelltypen darstellen. Daneben führt auch Hypoxie zu einer verstärkten Expression von Grid1. Nach Klonierung des Promotors und der Analyse seiner Aktivierung nach Cytokinstimulation wurde deutlich, dass für EPO charakteristische Signalkaskaden für die beobachteten Effekte verantwortlich sind.

Auch auf Proteinebene lässt sich zeigen, dass EPO-abhängige Signale zur Phosphorylierung des GluD1-Rezeptors und zunehmender Assoziation mit der verwandten NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors führen.

Über die physiologischen Hintergründe lässt sich gegenwärtig nur spekulieren, da die Funktion des Rezeptors noch weitgehend unklar bleibt. Die zur Zeit bekannten Daten sprechen für eine Beteiligung von GluD1 in der Synaptogenese und der glutamatergen Neurotransmission. Möglicherweise sind die beschriebenen Effekte Teil der in vielen Systemen nachgewiesenen neuroprotektiven und neuromodulatorischen Funktionen von EPO.

Für die weitere Aufklärung EPO-abhängiger Prozesse im ZNS erscheint es sinnvoll, insbesondere die Funktion des GluD1-Rezeptors weiter zu analysieren und darüberhinaus die Frage in den Vordergrund zu stellen, ob in Modellen, in denen EPO neuroprotektiv wirkt, entsprechende Veränderungen in der Expression von Grid1 bzw der Funktion von GluD1 nachweisbar sind.

8 Anhang

8.1 DNA-Sequenzen der klonierten Grid1-Promotor-Fragmente der Ratte

Fragment 1 (kursiv: Primer; unterstrichen: bisher unbekannte Sequenz)

*CCCGCCGCCTGCCCTTTAAG*CATCCCGGTGCCTGGCTCGGTGCCCCAGGC
 TGTGGTCTTTCCGCAGGCTGCTAGAGTTGGGGGTTCGGGTTCAGAGAGCGG
 CTGTCCTTTCTGGCCACCCGCAGGACTGCAGAATCTCCGCTGAAGTCCCC
 CCAGCGCCAGCGAGTTCCGAGCTCCCCCTCCCCGAGGGTTGTCGATGGCT
 GTGCCTCCTCCGTTTCTCCAGCGAACCCGGAGGCCAGGCCACACGGCC
AAGCCTAGACTCGCTTCAGACCCGCCAGGTCCCCTCCGTGGTGCCGT
CCTCGTAGCATCCCCCGGTTCGGGAGCGCGGAGTACCGGGCGCCCCC
TCCGTGCAACGAGCGGGCGAGCGGCGCGCGGCTAGGCTAAGGCTCC
GCAGTCACGTGGTGGAGAGGAGGGCGGAGGGGAGGGAGGGCGGGCG
GGAGGGGAGGGGGAGCGCCGCCGAGGGGGAGGGGGAGGGGAGGGG
 GCGTCCTCCGCAGTTCGCTCTTCGCCTGGGCTCAGACACACAGCCAGCCC
 GGAGCCGCGCGCGGGCCGGGCCGCCGCCGCTCTGCCTCTGCCGCCCCC
 AGAGCCGCTTAAGCCGCTGGAAGCGCCGCCGCCACAGCCGCGGGCCGCC
 CCCGCCGCGCCGGCCTGTGCTCGGGCTGCGAGCGCCGCCGCAACCGCAA
 CCAGAGCCGGCGCGGGAGCCCGAGAGCGCTGGGGCTGGGGCTGGGGCTGGG

Fragment 2 (kursiv: Primer)

*TCCGCAGTTCGCTCTTCGCCT*GGGCTCAGACACACAGCCAGCCCGGAGCC
 GCCGCGCGGGCCGGGCCGCCGCCGCTCTGCCTCTGCCGCCCCCAGAGCC
 GCTTAAGCCGCTGGAAGCGCCGCCGCCACAGCCGCGGGCCGCCCGGCC
 GCGCCGGCCTGTGCTCGGGCTGCGAGCGCCGCCGCAACCGCAACCAGAG
 CCGGCGCGGGAGCCCGAGAGCGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGTGGGGC
 GGGCGCAGGGCGCAGGGGCGGGAGCGCGGGGGAAGACGCACGGGCGGG
 CTCGGCTCTCCCGGGGAGCGGCCCGGGACTGCACCGGGACCGGCGCCTC
 CCCGCTCCGCGCTGCCCTCGGCCTCGCCCCGGGCCCGGGCGGATGAGCCG
 CGCGCCCGGGGGACATGGAAAGCGCTGACGCTGTGG

**Gesamtes Promotorfragment (913bp), zusammengesetzt aus Fragment 1 und 2
(kursiv: AflII-Schnittstelle)**

CCCGCCGCCTGCCCTTTAAGCATCCCGGTGCCTGGCTCGGTGCCCCAGGC
TGTGGTCTTTCCGCAGGCTGCTAGAGTTGGGGGTCGGGTTCGAGAGCGG
CTGTCCTTTCTGGCCACCCGCAGGACTGCAGAATCTCCGCTGAAGTCCCC
CCAGCGCCAGCGAGTTCCGAGCTCCCCCTCCCCGAGGGTTGTCGATGGCT
GTGCCTCCTCCGTTTCTCCAGCGAACCCGGAGGCCAGGCCCACACGGCCA
AGCCTAGACTCGCTTCAGACCCGCCAGGTCCCCTCCGTGGTGCCGTCCTC
GTAGCATCCCCCGGTTCGGGAGCGCGGAGTACCGGGCGCCCCCTCCGTGC
AACGAGCGGGCGAGCGGCGCGCGGCTAGGCTAAGGCTCCGCAGTCACGT
GGTGGAGAGGAGGGCGGAGGGGAGGGAGGCGGGCGGGAGGGGAGGGG
GAGCGCCGCCGAGGGGGAGGGGGAGGGGAGGGGGCGTCCTCCGCAGTT
CGCTCTTCGCCTGGGCTCAGACACACAGCCAGCCCGGAGCCGCCGCGCG
GGCCGGGCGCCGCCGCCCTCTGCCTCTGCCGCCCCCAGAGCCG**CTTAAGC**
CGCTGGAAGCGCCGCCGCCACAGCCGCGGGCCGCCCCCGCCGCGCCGGC
CTGTGCTCGGGCTGCGAGCGCCGCCGCAACCGCAACCAGAGCCGGCGCG
GGAGCCCGAGAGCGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGTTGGGGCGGGCGCAG
GGCGCAGGGGCGGGAGCGCGGGGGAAGACGCACGGGCGGGCTCGGCTC
TCCCGGGGAGCGGCCCGGGACTGCACCGGGACCGGCGCCTCCCCGCTCC
GCGCTGCCCTCGGCCTCGCCCCGGGCCCCGGGCGGATGAGCCGCGCGCCC
GGGGGACATGGAAGCGCTGACGCTGTGG

8.2 Verwendete PCR-Primer

PCR-Primer zur Klonierung von Grid1

- Primer 1:** 5'-GGTACC CCGGGACTGCACCGGGACC-3'
Primer 2: 5'-GGAACATACAATGAGCGTGAAGAGCC-3'
Primer 3: 5'-TCGGTGAACCTCTGTGGCCATGC-3'
Primer 4: 5'-CTCGAG CTCTGCTGGTCGGGTGGGCT-3'

PCR-Primer zur Klonierung der Grid1-Promotorsequenz

- Primer 5:** 5'-GGTACCCCCGCCGCCTGCCCTTTAAG-3'
Primer 6: 5'-CCCAACCCAGCCCAGCCCA-3'
Primer 7: 5'-TCCGCAGTTCGCTCTTCGCC-3'
Primer 8: 5'-CTCGAGCCACAGCGTCAGCGCTTCCA-3'

PCR-Primer zum Nachweis Grid1 (Primer 9 mit 100 % Übereinstimmung bei Maus, Ratte, Mensch; Primer 10 mit 1 mismatch beim Menschen)

- Primer 9:** 5'-GTGAATGAGGAAATCAGTGACCC-3'
Primer 10: 5'-CACAAAAGGCTCTTCCAAGACAG-3'

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Primärstruktur von rekombinantem, humanem Erythropoetin (Ng et al. 2003)	3
Abbildung 2 Regulation der Erythrozytenzahl durch EPO [modifiziert nach Bunn (2013)]:	4
Abbildung 3 Schematische Darstellung der EPO-abhängigen Signaltransduktion	6
Abbildung 4 Zusammenfassung der neuroprotektiven EPO-Effekte	13
Abbildung 5 Vektorkarte pGL3-Basic [Promega]	20
Abbildung 6 Primer zur Klonierung der Grid1-cDNA aus Cortex-cDNA (Primer 1-4) und des Grid1-Promotors (Primer 5-8)	24
Abbildung 7 Kovalente Bindung der Topoisomerase I des Vaccinia-Virus am pCR2.1-TOPO-Vektor [Invitrogen]	26
Abbildung 8 Vektorkarten pcDNA3.1 (+) [Invitrogen]	28
Abbildung 9 Vektorkarte pSELECT-puro-mcs [InvivoGen]	28
Abbildung 10 Expression von Grid1 in Zelllinien und Geweben verschiedener Spezies	37
Abbildung 11 EPOR-abhängige Induktion von Grid1 in parentalen, EGF/EPOR- und rEPOR-HEK293-Zellklonen	38
Abbildung 12 Hypoxie-abhängige Induktion von Grid1 in HEK293-Zellen	39
Abbildung 13 Schematische Darstellung der genomischen Organisation der Promotorregion des Grid1-Gens: angegeben sind die Positionen der PCR-Primer, des Startcodons und der Lokalisation der bisher in Datenbanken nicht verfügbaren Sequenz	40
Abbildung 14 Herstellung eines Reportergenkonstruktes mit der putativen regulatorischen Sequenz des Grid1-Promotors (pGL3-913)	41
Abbildung 15 Cytokinabhängige Induktion von Reportergenkonstrukten nach transienter Transfektion von Ba/F3_EPOR-Zellen	42
Abbildung 16 Konzentrationsabhängige Stimulation des Grid1-Promotors durch EPO	42
Abbildung 17 Einfluss der Überexpression von JAK2-cDNA-Konstrukten auf die EPO-abhängige Induktion des Grid1-Promotors	43
Abbildung 18 Einfluss der Überexpression von Lyn-cDNA-Konstrukten auf die EPO-abhängige Induktion des Grid1-Promotors	44

Abbildung 19 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den JAK2-Inhibitor AG-490.....	45
Abbildung 20 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den MEK1/2-Inhibitor PD 98059	46
Abbildung 21 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den p38-MAPKinase-Inhibitor SB203580	46
Abbildung 22 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002.....	47
Abbildung 23 Dosisabhängige Hemmung der Grid1-Promotoraktivierung durch den PKA-Inhibitor H-89	47
Abbildung 24 Amplifikation der kodierenden Sequenz des Grid1-Gens aus cDNA durch PCR.....	48
Abbildung 25 Herstellung eines Expressionsplasmids zur Überexpression von Grid1	49
Abbildung 26 Transiente Expression von rGluD1 in HEK293_rEPOR-Zellen	49
Abbildung 27 GluD1 wird nach EPO-Stimulation an Tyrosinresten phosphoryliert	50
Abbildung 28 Die cDNA für den Ratten-EPOR wurde in den Expressionsvektor pSelect-puro-mcs kloniert (a) und nach Elektroporation und Puromycinselektion stabil in ST14A-Zellen exprimiert (b).....	51
Abbildung 29 Der ionotrope Glutamatrezeptor NR2A ist in GluD1-Immunpräzipitaten nachweisbar (IP: Immunpräzipitation, WB: Western Blot).....	52

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der metabotropen Glutamatrezeptoren und ihrer intrazellulären Signalwege.....	9
Tabelle 2 Weitere verwendete Zelllinien, deren Herkunftsspezies und -gewebe sowie Erstbeschreiber.....	18
Tabelle 3 Typisches PCR-Protokoll im Thermocycler (Sensoquest Labcycler)	23
Tabelle 4 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für SDS-PAGE.....	34
Tabelle 5 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgelpuffer für SDS-PAGE.....	35
Tabelle 6 Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers für SDS-PAGE.....	35
Tabelle 7 Zusammensetzung des Transferpuffers zum Übertragen der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran.....	35

8.5 Abkürzungsverzeichnis:

Abkürzung	Begriff
μF	Mikrofarad (10^{-6} F)
μg	Mikrogramm (10^{-6} g)
μl	Mikroliter
AKT	Proteinkinase B
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5 methyl-4-isoxazole propionic acid</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ba/F3-EPOR	EPOR-überexprimierende Ba/F3-Zellen
Ba/F3-Zellen	<i>B-cell activating factor 3</i> (=Interleukin 3)
BALB/c	<i>Bagg albino/line c</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB-binding-protein</i>
CD131	<i>cluster of differentiation 131</i> entspricht der β -Untereinheit des IL-3, IL-5 und GM-CSF-Rezeptors
cDNA	Komplementäre DNA
COS	<i>CV-1 in Origin with SV40 genes</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAG	Diacylglycerin
DCC	<i>deleted-in-colorectal-cancer</i>
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant negative Mutante
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	15-25 Desoxythymidin
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetinrezeptor
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
FKS	fetales Kälberserum
fmol	Femtomol (10^{-15} Mol)
g	Gravitationsfeldstärke

g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GH	Wachstumshormon
GluD1	Glutamat-Rezeptor-Delta-1-Untereinheit
GluD2	Glutamat-Rezeptor-Delta-2-Untereinheit
GluR	Untereinheit der AMPA, bzw. Kainat Glutamatrezeptoren
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Grid1	Bezeichnung für das Gen der Glutamat-Rezeptor-Delta- 1-Untereinheit
Grid2	Bezeichnung für das Gen der Glutamat-Rezeptor-Delta- 2-Untereinheit
h	Stunde(n)
HEK293	<i>human embryonic kidney</i> -Zelllinie
HEK293_EGF/EPOR	EGF/EPOR Hybridrezeptor überexprimierende HEK293 Zellen
HEK293_rEPOR	Ratten EPOR überexprimierende HEK293-Zellen
HIF1	<i>hypoxia-inducible-factor 1</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
iGluR	Ionotrope Glutamatrezeptoren
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IκB	<i>inhibitor of nuclear factor-κB</i>
J2E	<i>J2 retrovirus erythroid cells</i>
JAK2	Janus-Kinase 2
KA	Untereinheiten der Kainat Glutamatrezeptoren
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LTD	<i>long term depression</i>
mA	Milliampere (10 ⁻³ A)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>MAPK/extracellular signal-regulated kinase</i>
MG	Molekulargewicht(-Marker)
mGluR	Metabotrope Glutamatrezeptoruntereinheit
min	Minute(n)
ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
MLI	<i>molecular layer interneuron</i>

M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	Boten-RNA
mV	Millivolt (10^{-3} V)
NF κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NR	Untereinheit der NMDA Glutamatrezeptoren
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PC12	<i>pheochromocytoma cells</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
pmol	Picomol (10^{-12} mol)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoetin
RNA	Ribonukleinsäure
RRID	<i>Research Resource Identifiers</i>
RT	Reverse Transkriptase
S.O.C.	<i>Super Optimal Broth</i> (Medium) + 20 Millimol Glucose
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> = Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec	Sekunde(n)
SH2 / SH2-Domänen	<i>src-homology 2 / src-homology 2 domains</i>
SHP1	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
SNPs	Single nucleotid polymorphisms
ST14A	Striatalen Zellen von 14 Tage alten Rattenembryonen
ST14A_rEPOR	Ratten EPOR überexprimierende ST14A-Zellen
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SV40	Simian-Virus 40
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPR	<i>tissue protective receptor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/ μ l	Unit (Enzymeinheit) pro Mikroliter
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem
β cR	<i>β-common-receptor</i>

8.6 Literaturverzeichnis

Ady, Visou; Perroy, Julie; Tricoire, Ludovic; Piochon, Claire; Dadak, Selma; Chen, Xiaoru et al. (2014): Type 1 metabotropic glutamate receptors (mGlu1) trigger the gating of GluD2 delta glutamate receptors. In: *EMBO reports* 15 (1), S. 103–109. DOI: 10.1002/embr.201337371.

Almaguer-Melian, William; Merceron-Martinez, Daymara; Delgado-Ocana, Susana; Pavon-Fuentes, Nancy; Ledon, Nuris; Bergado, Jorge A. (2016): EPO induces changes in synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of rats. In: *Synapse (New York, N.Y.)* 70 (6), S. 240–252. DOI: 10.1002/syn.21895.

Baxter, L. R., JR; Schwartz, J. M.; Phelps, M. E.; Mazziotta, J. C.; Guze, B. H.; Selin, C. E. et al. (1989): Reduction of prefrontal cortex glucose metabolism common to three types of depression. In: *Archives of general psychiatry* 46 (3), S. 243–250.

Benamer, N.; Marti, F.; Lujan, R.; Hepp, R.; Aubier, T. G.; Dupin, A. A. M. et al. (2017): GluD1, linked to schizophrenia, controls the burst firing of dopamine neurons. In: *Molecular Psychiatry*. DOI: 10.1038/mp.2017.137.

Bernaudin, M.; Marti, H. H.; Roussel, S.; Divoux, D.; Nouvelot, A.; MacKenzie, E. T.; Petit, E. (1999): A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19 (6), S. 643–651. DOI: 10.1097/00004647-199906000-00007.

Bircher, Joseph S.; Dukhovny, Dmitry (2018): Does Erythropoietin monotherapy reduce mortality or moderate/severe disability in neonates with hypoxic ischaemic encephalopathy? In: *Acta Paediatrica* 107 (4), S. 722. DOI: 10.1111/apa.14195.

Bittorf, Thomas; Büchse, Tom; Sasse, Tilo; Jaster, Robert; Brock, Josef (2001): Activation of the transcription factor NF- κ B by the erythropoietin receptor: Structural requirements and biological significance. In: *Cellular Signalling* 13 (9), S. 673–681. DOI: 10.1016/S0898-6568(01)00189-9.

Blixt, Jonas; Gunnarson, Eli; Wanecek, Michael (2018): Erythropoietin Attenuates the Brain Edema Response after Experimental Traumatic Brain Injury. In: *Journal of neurotrauma* 35 (4), S. 671–680. DOI: 10.1089/neu.2017.5015.

- Bockaert, J.; Pin, J. P. (1999): Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. In: *The EMBO Journal* 18 (7), S. 1723–1729. DOI: 10.1093/emboj/18.7.1723.
- Boer, Arjen-Kars; Drayer, A. Lyndsay; Rui, Hallgeir; Vellenga, Edo (2002): Prostaglandin-E2 enhances EPO-mediated STAT5 transcriptional activity by serine phosphorylation of CREB. In: *Blood* 100 (2), S. 467–473. DOI: 10.1182/blood.V100.2.467.
- Boer, Arjen-Kars; Drayer, A. Lyndsay; Vellenga, Edo (2003): Stem cell factor enhances erythropoietin-mediated transactivation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) via the PKA/CREB pathway. In: *Experimental Hematology* 31 (6), S. 512–520. DOI: 10.1016/S0301-472X(03)00075-4.
- Bonnas, Christel; Wüstefeld, Liane; Winkler, Daniela; Kronstein-Wiedemann, Romy; Dere, Ekrem; Specht, Katja et al. (2017): EV-3, an endogenous human erythropoietin isoform with distinct functional relevance. In: *Scientific Reports* 7. DOI: 10.1038/s41598-017-03167-0.
- Broxmeyer, Hal E. (2013): Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. In: *J. Exp. Med.* 210 (2), S. 205–208. DOI: 10.1084/jem.20122760.
- Büchse, Tom; Prietzs, Holger; Sasse, Tilo; Körbel, Sandra; Stigge, Gunnar; Bogdanow, Simon et al. (2006): Profiling of Early Gene Expression Induced by Erythropoietin Receptor Structural Variants. In: *J. Biol. Chem.* 281 (12), S. 7697–7707. DOI: 10.1074/jbc.M508481200.
- Buemi, Michele; Allegra, Alessandro; Corica, Francesco; Floccari, Fulvio; D'Avella, Domenico; Aloisi, Carmela et al. (2000): Intravenous recombinant erythropoietin does not lead to an increase in cerebrospinal fluid erythropoietin concentration. In: *Nephrol Dial Transplant* 15 (3), S. 422–423. DOI: 10.1093/ndt/15.3.422.
- Bulut, Gamze B.; Sulahian, Rita; Yao, Huiyu; Huang, Lily Jun-shen (2013): Cbl ubiquitination of p85 is essential for Epo-induced EpoR endocytosis. In: *Blood* 122 (24), S. 3964–3972. DOI: 10.1182/blood-2013-05-506212.
- Bunn, H. Franklin (2013): Erythropoietin. In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 3 (3), S. a011619. DOI: 10.1101/cshperspect.a011619.

Byts, N.; Samoylenko, A.; Fasshauer, T.; Ivanisevic, M.; Hennighausen, L.; Ehrenreich, H.; Sirén, A-L (2008): Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin. In: *Cell Death and Differentiation* 15 (4), S. 783. DOI: 10.1038/cdd.2008.1.

Byts, Nadiya; Siren, Anna-Leena (2009): Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. In: *Experimental & translational stroke medicine* 1, S. 4. DOI: 10.1186/2040-7378-1-4.

Calvo-Anguiano, Geovana; Lugo-Trampe, Jose J.; Camacho, Alberto; Said-Fernandez, Salvador; Mercado-Hernandez, Roberto; Zomosa-Signoret, Viviana et al. (2018): Comparison of specific expression profile in two in vitro hypoxia models. In: *Experimental and therapeutic medicine* 15 (6), S. 4777–4784. DOI: 10.3892/etm.2018.6048.

Carnot, P.; Deflandre, C. (1906): Sur l'activite hemopoietique des differents organeau au cours de la regernation du sang. In: *CR Searces Acad Sci* 143, S. 432–435.

Castillo, C.; Zaror, S.; Gonzalez, M.; Hidalgo, A.; Burgos, C. F.; Cabezas, O. I. et al. (2018): Neuroprotective effect of a new variant of Epo nonhematopoietic against oxidative stress. In: *Redox biology* 14, S. 285–294. DOI: 10.1016/j.redox.2017.09.010.

Cattaneo, Elena; Conti, Luciano (1998): Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. In: *Journal of Neuroscience Research* 53 (2), S. 223–234. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19980715)53:2<223::AID-JNR11>3.0.CO;2-7.

Chatagner, A.; Hüppi, P. S.; Ha-Vinh Leuchter, R.; Sizonenko, S. (2010): Érythropoïétine et neuroprotection. In: *Archives de Pédiatrie* 17, S78-S84. DOI: 10.1016/S0929-693X(10)70905-2.

Chateauvieux, S.; Grigorakaki, C.; Morceau, F.; Dicato, M.; Diederich, M. (2011): Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. In: *Biochem. Pharmacol.* 82 (10), S. 1291–1303. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.06.045.

Chatpong, S.; Tanamai, J.; Kiatsomchai, P.; Nakatsu, M.; Sereemasapun, A.; Pimpha, N. et al. (2013): Glutaraldehyde erythropoietin protects kidney in ischaemia/reperfusion injury without increasing red blood cell production. In: *British Journal of Pharmacology* 168 (1), S. 189–199. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02123.x.

- Chen, Jiayu; Hutchison, Kent E.; Calhoun, Vince D.; Claus, Eric D.; Turner, Jessica A.; Sui, Jing; Liu, Jingyu (2015): CREB-BDNF pathway influences alcohol cue-elicited activation in drinkers. In: *Human brain mapping* 36 (8), S. 3007–3019. DOI: 10.1002/hbm.22824.
- Cheng, Shouqiang; Seven, Alpaz B.; Wang, Jing; Skinotis, Georgios; Özkan, Engin (2016): Conformational Plasticity in the Transsynaptic Neurexin-Cerebellin-Glutamate Receptor Adhesion Complex. In: *Structure* 24 (12), S. 2163–2173. DOI: 10.1016/j.str.2016.11.004.
- Chin, Hiroshi; Arai, Ayako; Wakao, Hiroshi; Kamiyama, Ryuichi; Miyasaka, Nobuyuki; Miura, Osamu (1998): Lyn Physically Associates With the Erythropoietin Receptor and May Play a Role in Activation of the Stat5 Pathway. In: *Blood* 91 (10), S. 3734–3745.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Dadak, Selma; Bouquier, Nathalie; Goyet, Elise; Fagni, Laurent; Levenes, Carole; Perroy, Julie (2017): mGlu1 receptor canonical signaling pathway contributes to the opening of the orphan GluD2 receptor. In: *Neuropharmacology* 115, S. 92–99. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.06.001.
- Dai, Ying; Li, Wendi; Zhong, Min; Chen, Jie; Cheng, Qian; Liu, Youxue; Li, Tingyu (2017): The paracrine effect of cobalt chloride on BMSCs during cognitive function rescue in the HIBD rat. In: *Behavioural brain research* 332, S. 99–109. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.05.055.
- Dame, C.; Juul, S. E.; Christensen, R. D. (2001): The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. In: *Biology of the neonate* 79 (3-4), S. 228–235.
- Digicaylioglu, M.; Bichet, S.; Marti, H. H.; Wenger, R. H.; Rivas, L. A.; Bauer, C.; Gassmann, M. (1995): Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. In: *PNAS* 92 (9), S. 3717–3720. DOI: 10.1073/pnas.92.9.3717.

Digicaylioglu, Murat; Lipton, Stuart A. (2001): Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. In: *Nature* 412 (6847), S. 641. DOI: 10.1038/35088074.

Dik, Andre; Saffari, Roja; Zhang, Mingyue; Zhang, Weiqi (2018): Contradictory effects of erythropoietin on inhibitory synaptic transmission in left and right prelimbic cortex of mice. In: *Neurobiology of Stress* 9, S. 113–123. DOI: 10.1016/j.ynstr.2018.08.008.

Dingledine, Raymond; Borges, Karin; Bowie, Derek; Traynelis, Stephen F. (1999): The Glutamate Receptor Ion Channels. In: *Pharmacol Rev* 51 (1), S. 7–62. Online verfügbar unter <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/51/1/7.full>.

Edwards, Alexis C.; Aliev, Fazil; Bierut, Laura J.; Bucholz, Kathleen K.; Edenberg, Howard; Hesselbrock, Victor et al. (2012): Genome-wide association study of comorbid depressive syndrome and alcohol dependence. In: *Psychiatric genetics* 22 (1), S. 31–41. DOI: 10.1097/YPG.0b013e32834acd07.

Ehrenreich, H.; Hinze-Selch, D.; Stawicki, S.; Aust, C.; Knolle-Veentjer, S.; Wilms, S. et al. (2007): Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. In: *Molecular Psychiatry* 12 (2), S. 206–220. DOI: 10.1038/sj.mp.4001907.

Eisenga, Michele F.; Kieneker, Lyanne M.; Touw, Daan J.; Nolte, Ilja M.; van der Meer, Peter; Huls, Gerwin et al. (2018): Active Smoking and Hematocrit and Fasting Circulating Erythropoietin Concentrations in the General Population. In: *Mayo Clinic proceedings* 93 (3), S. 337–343. DOI: 10.1016/j.mayocp.2018.01.005.

Elegheert, Jonathan; Kakegawa, Wataru; Clay, Jordan E.; Shanks, Natalie F.; Behiels, Ester; Matsuda, Keiko et al. (2016): Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes. In: *Science* 353 (6296), S. 295–299. DOI: 10.1126/science.aae0104.

Fandrey, Joachim (2004): Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 (6), S. 88. DOI: 10.1152/ajpregu.00577.2003.

Fernando, Garzón; Yamila, Rodríguez; Cesar, García Julio; Ramón, Rama (2018): Neuroprotective Effects of neuroEPO Using an In Vitro Model of Stroke. In: *Behavioral Sciences* 8 (2). DOI: 10.3390/bs8020026.

Gantner, Dashiell C.; Bailey, Michael; Presneill, Jeffrey; French, Craig J.; Nichol, Alistair; Little, Lorraine; Bellomo, Rinaldo (2018): Erythropoietin to Reduce Mortality in Traumatic Brain Injury: A Post-hoc Dose-effect Analysis. In: *Annals of surgery* 267 (3), S. 585–589. DOI: 10.1097/SLA.0000000000002142.

Gao, Jiangang; Maison, Stephane F.; Wu, Xudong; Hirose, Keiko; Jones, Sherri M.; Bayazitov, Ildar et al. (2007): Orphan glutamate receptor delta1 subunit required for high-frequency hearing. In: *Molecular and cellular biology* 27 (12), S. 4500–4512. DOI: 10.1128/MCB.02051-06.

Ghosh, Krishna K.; Haverkamp, Silke; Wässle, Heinz (2001): Glutamate Receptors in the Rod Pathway of the Mammalian Retina. In: *J. Neurosci.* 21 (21), S. 8636–8647. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/21/21/8636.full.pdf>.

Gluzman, Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. In: *Cell* 23 (1), S. 175–182.

Good, Jean-Marc; Mahoney, Michael; Miyazaki, Taisuke; Tanaka, Kenji F.; Sakimura, Kenji; Watanabe, Masahiko et al. (2017): Maturation of Cerebellar Purkinje Cell Population Activity during Postnatal Refinement of Climbing Fiber Network. In: *Cell reports* 21 (8), S. 2066–2073. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.101.

Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. In: *Journal of General Virology* 36 (1), S. 59–72. DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59.

Greene, L. A.; Tischler, A. S. (1976): Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (7), S. 2424–2428.

Gunnarson, Eli; Song, Yutong; Kowalewski, Jacob M.; Brismar, Hjalmar; Brines, Michael; Cerami, Anthony et al. (2009): Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (5), S. 1602–1607. DOI: 10.1073/pnas.0812708106.

Gupta, Subhash C.; Yadav, Roopali; Pavuluri, Ratnamala; Morley, Barbara J.; Stairs, Dustin J.; Dravid, Shashank M. (2015): Essential role of GluD1 in dendritic spine development and GluN2B to GluN2A NMDAR subunit switch in the cortex and

hippocampus reveals ability of GluN2B inhibition in correcting hyperconnectivity. In: *Neuropharmacology* 93, S. 274–284. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.02.013.

Gyetzai, Georgina; Hughes, Trisha; Wedmore, Florence; Roe, Cieron; Heikal, Lamia; Ghezzi, Pietro; Mengozzi, Manuela (2017): Erythropoietin Increases Myelination in Oligodendrocytes: Gene Expression Profiling Reveals Early Induction of Genes Involved in Lipid Transport and Metabolism. In: *Frontiers in Immunology* 8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01394.

Hand, Carla Cerami; Brines, Michael (2011): Promises and pitfalls in erythropoietin-mediated tissue protection: are nonerythropoietic derivatives a way forward? In: *J Investig Med* 59 (7), S. 1073–1082. DOI: 10.231/JIM.0b013e3181ed30bf.

Hashimoto, Kouichi; Ichikawa, Ryoichi; Takechi, Hajime; Inoue, Yoshiro; Aiba, Atsu; Sakimura, Kenji et al. (2001): Roles of Glutamate Receptor $\delta 2$ Subunit (GluR $\delta 2$) and Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 (mGluR1) in Climbing Fiber Synapse Elimination during Postnatal Cerebellar Development. In: *J. Neurosci.* 21 (24), S. 9701–9712. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-24-09701.2001.

Heir, Pardeep; Srikumar, Tharan; Bikopoulos, George; Bunda, Severa; Poon, Betty P.; Lee, Jeffrey E. et al. (2016): Oxygen-dependent Regulation of Erythropoietin Receptor Turnover and Signaling. In: *J. Biol. Chem.* 291 (14), S. 7357–7372. DOI: 10.1074/jbc.M115.694562.

Hellewell, Sarah C.; Mondello, Stefania; Conquest, Alison; Shaw, Gerry; Madorsky, Irina; Deng, Jay V. et al. (2018): Erythropoietin Does Not Alter Serum Profiles of Neuronal and Axonal Biomarkers After Traumatic Brain Injury: Findings From the Australian EPO-TBI Clinical Trial. In: *Critical care medicine* 46 (4), S. 554–561. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002938.

Hepp, Regine; Hay, Y. Audrey; Aguado, Carolina; Lujan, Rafael; Dauphinot, Luce; Potier, Marie Claude et al. (2015): Glutamate receptors of the delta family are widely expressed in the adult brain. In: *Brain structure & function* 220 (5), S. 2797–2815. DOI: 10.1007/s00429-014-0827-4.

Hermine, O.; Beru, N.; Pech, N.; Goldwasser, E. (1991): An autocrine role for erythropoietin in mouse hematopoietic cell differentiation. In: *Blood* 78 (9), S. 2253–2260.

Hirai, H. (2000): Clustering of delta glutamate receptors is regulated by the actin cytoskeleton in the dendritic spines of cultured rat Purkinje cells. In: *The European Journal of Neuroscience* 12 (2), S. 563–570.

Hirai, H.; Matsuda, S. (1999): Interaction of the C-terminal domain of delta glutamate receptor with spectrin in the dendritic spines of cultured Purkinje cells. In: *Neuroscience research* 34 (4), S. 281–287.

Hironaka, K.; Umemori, H.; Tezuka, T.; Mishina, M.; Yamamoto, T. (2000): The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor delta 2 and epsilon subunits. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (21), S. 16167–16173. DOI: 10.1074/jbc.M909302199.

Hong, Hea Nam; Shim, Ju Hee; Won, You Jin; Yoo, Jong Yoon; Hwang, Chang Ho (2018): Therapeutic time window for the effects of erythropoietin on astrogliosis and neurite outgrowth in an in vitro model of spinal cord injury. In: *Medicine* 97 (9), e9913. DOI: 10.1097/MD.00000000000009913.

Hoxha, Eriola; Balbo, Ilaria; Miniaci, Maria Concetta; Tempia, Filippo (2018): Purkinje Cell Signaling Deficits in Animal Models of Ataxia. In: *Frontiers in synaptic neuroscience* 10, S. 6. DOI: 10.3389/fnsyn.2018.00006.

Hsu, Pei-Lun; Horng, Lin-Yea; Peng, Kang-Yung; Wu, Chia-Ling; Sung, Hui-Ching; Wu, Rong-Tsun (2013): Activation of mitochondrial function and Hb expression in non-haematopoietic cells by an EPO inducer ameliorates ischaemic diseases in mice. In: *British Journal of Pharmacology* 169 (7), S. 1461–1476. DOI: 10.1111/bph.12197.

Huang, Chiu-Ku; Chang, Yen-Ting; Amstislavskaya, Tamara G.; Tikhonova, Maria A.; Lin, Chih-Li; Hung, Ching-Sui et al. (2015): Synergistic effects of ceftriaxone and erythropoietin on neuronal and behavioral deficits in an MPTP-induced animal model of Parkinson's disease dementia. In: *Behavioural brain research* 294, S. 198–207. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.08.011.

Ito-Ishida, Aya; Miyazaki, Taisuke; Miura, Eriko; Matsuda, Keiko; Watanabe, Masahiko; Yuzaki, Michisuke; Okabe, Shigeo (2012): Presynaptically Released Cbln1 Induces Dynamic Axonal Structural Changes by Interacting with GluD2 during Cerebellar Synapse Formation. In: *Neuron* 76 (3), S. 549–564. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.07.027.

Iwai, Masanori; Cao, Guodong; Yin, Wei; Stetler, R. Anne; Liu, Jialing; Chen, Jun (2007): Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. In: *Stroke* 38 (10), S. 2795–2803. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.483008.

Iwai, Masanori; Stetler, R. Anne; Xing, Juan; Hu, Xiaoming; Gao, Yanqin; Zhang, Wenting et al. (2010): Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. In: *Stroke* 41 (5), S. 1032–1037. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.570325.

Jacobs, K.; Shoemaker, C.; Rudersdorf, R.; Neill, S. D.; Kaufman, R. J.; Mufson, A. et al. (1985): Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. In: *Nature* 313 (6005), S. 806–810.

Jacobson, L. O.; Goldwasser, E.; Fried, W.; Plzak, L. (1957): Role of the kidney in erythropoiesis. In: *Nature* 179 (4560), S. 633–634.

Joo, Jae-Yeol; Lee, Sung-Jin; Uemura, Takeshi; Yoshida, Tomoyuki; Yasumura, Misato; Watanabe, Masahiko; Mishina, Masayoshi (2011): Differential interactions of cerebellin precursor protein (Cbln) subtypes and neuroligin variants for synapse formation of cortical neurons. In: *Biochemical and biophysical research communications* 406 (4), S. 627–632. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.108.

Juul, S. (2002): Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage. In: *Acta Paediatrica* 91, S. 36–42. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2002.tb02904.x.

Juul, Sandra E.; Comstock, Bryan A.; Heagerty, Patrick J.; Mayock, Dennis E.; Goodman, Amy M.; Hauge, Stephanie et al. (2018): High-Dose Erythropoietin for Asphyxia and Encephalopathy (HEAL): A Randomized Controlled Trial - Background, Aims, and Study Protocol. In: *Neonatology* 113 (4), S. 331–338. DOI: 10.1159/000486820.

Juul, Sandra E.; Harcum, Jenny; Li, Yan; Christensen, Robert D. (1997): Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates. In: *The Journal of Pediatrics* 130 (3), S. 428–430. DOI: 10.1016/S0022-3476(97)70205-1.

Juul, Sandra E.; Pet, Gillian C. (2015): Erythropoietin and Neonatal Neuroprotection. In: *Clinics in perinatology* 42 (3), S. 469–481. DOI: 10.1016/j.clp.2015.04.004.

Juul, Sandra E.; Stallings, Susan A.; Christensen, Robert D. (1999a): Erythropoietin in the Cerebrospinal Fluid of Neonates Who Sustained CNS Injury. In: *Pediatric research* 46 (5), S. 543. DOI: 10.1203/00006450-199911000-00009.

Juul, Sandra E.; Yachnis, Anthony T.; Rojiani, Aryn M.; Christensen, Robert D. (1999b): Immunohistochemical Localization of Erythropoietin and Its Receptor in the Developing Human Brain. In: *Pediatr. Dev. Pathol.* 2 (2), S. 148–158. DOI: 10.1007/s100249900103.

Takegawa, Wataru; Yuzaki, Michisuke (2018): Molecular Mechanisms for Learning and Memory: What Happens at the Synapses? In: *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo* 70 (7), S. 677–687. DOI: 10.11477/mf.1416201069.

Karin, M. (1999): How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. In: *Oncogene* 18 (49), S. 6867–6874. DOI: 10.1038/sj.onc.1203219.

Karmasin, Matthias; Ribing, Rainer (2014): Die Gestaltung wissenschaftlicher Arbeiten. Ein Leitfaden für Seminararbeiten, Bachelor-, Master- und Magisterarbeiten sowie Dissertationen. 8., aktualisierte Aufl. Wien: facultas.wuv (UTB Schlüsselkompetenzen, 2774). Online verfügbar unter <http://www.utb-studi-e-book.de/9783838542591>.

Kastner, Anne; Grube, Sabrina; El-Kordi, Ahmed; Stepniak, Beata; Friedrichs, Heidi; Sargin, Derya et al. (2012): Common variants of the genes encoding erythropoietin and its receptor modulate cognitive performance in schizophrenia. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 18, S. 1029–1040. DOI: 10.2119/molmed.2012.00190.

Kew, James N. C.; Kemp, John A. (2005): Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. In: *Psychopharmacology* 179 (1), S. 4–29. DOI: 10.1007/s00213-005-2200-z.

Kilic, Ertugrul; Kilic, Ulkan; Soliz, Jorge; Bassetti, Claudio L.; Gassmann, Max; Hermann, Dirk M. (2005): Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (14), S. 2026–2028. DOI: 10.1096/fj.05-3941fje.

Kirkeby, Agnete; van Beek, Johan; Nielsen, Jacob; Leist, Marcel; Helboe, Lone (2007): Functional and immunochemical characterisation of different antibodies

against the erythropoietin receptor. In: *Journal of neuroscience methods* 164 (1), S. 50–58. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2007.03.026.

Klingmüller, Ursula (1997): The Role of Tyrosine Phosphorylation in Proliferation and Maturation of Erythroid Progenitor Cells. In: *European Journal of Biochemistry* 249 (3), S. 637–647. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00637.x.

Klingmüller, Ursula; Schilling, Marcel (2017): e. Bio - Modul II - Verbundprojekt: SBEpo - Systembiologie von Erythropoetin: Mehrstufige mathematische Modellierung der Erythropoese für die optimierte Expansion von erythroiden Vorläuferzellen und für verbesserte Behandlungsmethoden - Teilprojekt B : Schlussbericht : 01.01.2013-30.06.2016. Heidelberg: Deutsches Krebsforschungszentrum.

Klinken, S. P.; Nicola, N. A.; Johnson, G. R. (1988): In vitro-derived leukemic erythroid cell lines induced by a raf- and myc-containing retrovirus differentiate in response to erythropoietin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (22), S. 8506–8510.

Konno, Kohtarou; Matsuda, Keiko; Nakamoto, Chihiro; Uchigashima, Motokazu; Miyazaki, Taisuke; Yamasaki, Miwako et al. (2014): Enriched Expression of GluD1 in Higher Brain Regions and Its Involvement in Parallel Fiber–Interneuron Synapse Formation in the Cerebellum. In: *J. Neurosci.* 34 (22), S. 7412–7424. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0628-14.2014.

Koshimura, Kunio; Murakami, Yoshio; Sohmiya, Motoi; Tanaka, Junko; Kato, Yuzuru (1999): Effects of Erythropoietin on Neuronal Activity. In: *Journal of Neurochemistry* 72 (6), S. 2565–2572. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722565.x.

Kotajima-Murakami, Hiroko; Narumi, Sakae; Yuzaki, Michisuke; Yanagihara, Dai (2016): Involvement of GluD2 in Fear-Conditioned Bradycardia in Mice. In: *PLOS ONE* 11 (11), e0166144. DOI: 10.1371/journal.pone.0166144.

Koury, M. J.; Bondurant, M. C. (1990): Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. In: *Science* 248 (4953), S. 378–381.

Kumral, Abdullah; Baskin, Huseyin; Yesilirmak, Didem Cemile; Ergur, Bekir Ugur; Aykan, Simge; Genc, Sermin et al. (2007): Erythropoietin attenuates

lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. In: *Neonatology* 92 (4), S. 269–278. DOI: 10.1159/000105493.

Kuroyanagi, Tomoaki; Hirano, Tomoo (2010): Flap loop of GluD2 binds to Cbln1 and induces presynaptic differentiation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 398 (3), S. 537–541. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.114.

Kuroyanagi, Tomoaki; Yokoyama, Marie; Hirano, Tomoo (2009): Postsynaptic glutamate receptor δ family contributes to presynaptic terminal differentiation and establishment of synaptic transmission. In: *PNAS* 106 (12), S. 4912–4916. DOI: 10.1073/pnas.0900892106.

Lai, P. H.; Everett, R.; Wang, F. F.; Arakawa, T.; Goldwasser, E. (1986): Structural characterization of human erythropoietin. In: *J Biol Chem* 261 (7), S. 3116–3121.

Landsend, A. S.; Amiry-Moghaddam, M.; Matsubara, A.; Bergersen, L.; Usami, S.; Wenthold, R. J.; Ottersen, O. P. (1997): Differential localization of delta glutamate receptors in the rat cerebellum: coexpression with AMPA receptors in parallel fiber-spine synapses and absence from climbing fiber-spine synapses. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (2), S. 834–842.

Lee, Sang Min; Hong Nga, Nguyen Thi; Park, Mi Hee; Kim, Kyung Soon; Cho, Kyoung Joo; Moon, Dong Cheul et al. (2004): EPO receptor-mediated ERK kinase and NF- κ B activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 320 (4), S. 1087–1095. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.06.060.

Lein, Ed S.; Hawrylycz, Michael J.; Ao, Nancy; Ayres, Mikael; Bensinger, Amy; Bernard, Amy et al. (2007): Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. In: *Nature* 445 (7124), S. 168–176. DOI: 10.1038/nature05453.

Li, Sijie; Hafeez, Adam; Noorulla, Fatima; Geng, Xiaokun; Shao, Guo; Ren, Changhong et al. (2017a): Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. In: *Progress in neurobiology*. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.001.

Li, Xian-Bin; Zheng, Wei; Ning, Yu-Ping; Cai, Dong-Bin; Yang, Xin-Hu; Ungvari, Gabor S. et al. (2017b): Erythropoietin for Cognitive Deficits Associated with Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depression: A Systematic Review. In: *Pharmacopsychiatry*. DOI: 10.1055/s-0043-114670.

- Lin, F. K.; Suggs, S.; Lin, C. H.; Browne, J. K.; Smalling, R.; Egrie, J. C. et al. (1985): Cloning and expression of the human erythropoietin gene. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (22), S. 7580–7584.
- Liu, Jing; Narasimhan, Purnima; Yu, Fengshan; Chan, Pak H. (2005): Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. In: *Stroke* 36 (6), S. 1264–1269. DOI: 10.1161/01.STR.0000166180.91042.02.
- Livide, Gabriella; Patriarchi, Tommaso; Amenduni, Mariangela; Amabile, Sonia; Yasui, Dag; Calcagno, Eleonora et al. (2015): GluD1 is a common altered player in neuronal differentiation from both MECP2-mutated and CDKL5-mutated iPS cells. In: *European journal of human genetics : EJHG* 23 (2), S. 195–201. DOI: 10.1038/ejhg.2014.81.
- Livnah, O. (1999): Crystallographic Evidence for Preformed Dimers of Erythropoietin Receptor Before Ligand Activation. In: *Science* 283 (5404), S. 987–990. DOI: 10.1126/science.283.5404.987.
- Lomeli, H.; Sprengel, R.; Laurie, D. J.; Kohr, G.; Herb, A.; Seeburg, P. H.; Wisden, W. (1993): The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. In: *FEBS letters* 315 (3), S. 318–322.
- Ly, C.Dune; Roche, Katherine W.; Lee, Ho-Ki; Wenthold, Robert J. (2002): Identification of Rat EMAP, a δ -Glutamate Receptor Binding Protein. In: *Biochemical and biophysical research communications* 291 (1), S. 85–90. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6413.
- Ma, Shengli; Chen, Juwu; Chen, Chen; Wei, Na; Xu, Jingjing; Yang, Guohui et al. (2018): Erythropoietin Rescues Memory Impairment in a Rat Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion via the EPO-R/JAK2/STAT5/PI3K/Akt/GSK-3 β Pathway. In: *Molecular Neurobiology* 55 (4), S. 3290–3299. DOI: 10.1007/s12035-017-0568-5.
- Madden, Dean R. (2002): The structure and function of glutamate receptor ion channels. In: *Nature Reviews Neuroscience* 3 (2), S. 91. DOI: 10.1038/nrn725.
- Magdaleno, Susan; Jensen, Patricia; Brumwell, Craig L.; Seal, Anna; Lehman, Karen; Asbury, Andrew et al. (2006): BGEM: an in situ hybridization database of gene expression in the embryonic and adult mouse nervous system. In: *PLoS biology* 4 (4), e86. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040086.

Maier, Andre; Klopocki, Eva; Horn, Denise; Tzschach, Andreas; Holm, Teresa; Meyer, Robert; Meyer, Thomas (2014): De novo partial deletion in GRID2 presenting with complicated spastic paraplegia. In: *Muscle & nerve* 49 (2), S. 289–292. DOI: 10.1002/mus.24096.

Mallet, Robert T.; Ryou, Myoung-Gwi (2017): Erythropoietin: Endogenous Protection of Ischemic Brain. In: *Vitam Horm* 105, S. 197–232. DOI: 10.1016/bs.vh.2017.01.002.

Marti, Hugo H.; Gassmann, Max; Wenger, Roland H.; Kvietikova, Ivica; Morganti-Kossmann, Maria Cristina; Kossmann, Thomas et al. (1997): Detection of erythropoietin in human liquor: Intrinsic erythropoietin production in the brain. In: *Kidney International* 51 (2), S. 416–418. DOI: 10.1038/ki.1997.55.

Masuda, S.; Chikuma, M.; Sasaki, R. (1997): Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. In: *Brain research* 746 (1-2), S. 63–70.

Masuda, S.; Okano, M.; Yamagishi, K.; Nagao, M.; Ueda, M.; Sasaki, R. (1994): A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (30), S. 19488–19493.

Matsuda, Keiko; Miura, Eriko; Miyazaki, Taisuke; Kakegawa, Wataru; Emi, Kyoichi; Narumi, Sakae et al. (2010): Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. In: *Science (New York, N.Y.)* 328 (5976), S. 363–368. DOI: 10.1126/science.1185152.

Mayer, Mark L. (2005): Glutamate receptor ion channels. In: *Current opinion in neurobiology* 15 (3), S. 282–288. DOI: 10.1016/j.conb.2005.05.004.

McPherson, Ronald J.; Juul, Sandra E. (2010): Erythropoietin (Epo) for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). In: *Current opinion in pediatrics* 22 (2), S. 139–145. DOI: 10.1097/MOP.0b013e328336eb57.

Miller, James L.; Church, Timothy J.; Leonoudakis, Dmitri; Lariosa-Willingham, Karen; Frigon, Normand L.; Tettenborn, Connie S. et al. (2015): Discovery and Characterization of Nonpeptidyl Agonists of the Tissue-Protective Erythropoietin Receptor. In: *Molecular pharmacology* 88 (2), S. 357–367. DOI: 10.1124/mol.115.098400.

Miskowiak, Kamilla W.; Ehrenreich, Hannelore; Christensen, Ellen M.; Kessing, Lars V.; Vinberg, Maj (2014a): Recombinant human erythropoietin to target cognitive dysfunction in bipolar disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. In: *The Journal of clinical psychiatry* 75 (12), S. 1347–1355. DOI: 10.4088/JCP.13m08839.

Miskowiak, Kamilla W.; Vinberg, Maj; Christensen, Ellen M.; Bukh, Jens D.; Harmer, Catherine J.; Ehrenreich, Hannelore; Kessing, Lars V. (2014b): Recombinant human erythropoietin for treating treatment-resistant depression: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (6), S. 1399–1408. DOI: 10.1038/npp.2013.335.

Miskowiak, Kamilla W.; Vinberg, Maj; Harmer, Catherine J.; Ehrenreich, Hannelore; Knudsen, Gitte M.; Macoveanu, Julian et al. (2010): Effects of erythropoietin on depressive symptoms and neurocognitive deficits in depression and bipolar disorder. In: *Trials* 11, S. 97. DOI: 10.1186/1745-6215-11-97.

Miyake, T.; Kung, C. K.; Goldwasser, E. (1977): Purification of human erythropoietin. In: *J Biol Chem* 252 (15), S. 5558–5564.

Montoye, Tony; Lemmens, Irma; Catteeuw, Dominiek; Eyckerman, Sven; Tavernier, Jan (2005): A systematic scan of interactions with tyrosine motifs in the erythropoietin receptor using a mammalian 2-hybrid approach. In: *Blood* 105 (11), S. 4264–4271. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2733.

Nathan, D. G.; Schupak, E.; Stohlman, F., JR; Merrill, J. P. (1964): Erythropoiesis in anephric man. In: *J Clin Invest* 43, S. 2158–2165. DOI: 10.1172/JCI105089.

Nenadic, Igor; Maitra, Raka; Scherpiet, Sigrid; Gaser, Christian; Schultz, C. Christoph; Schachtzabel, Claudia et al. (2012): Glutamate receptor delta 1 (GRID1) genetic variation and brain structure in schizophrenia. In: *Journal of Psychiatric Research* 46 (12), S. 1531–1539. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2012.08.026.

Nissenson, A. R. (1992): Epoetin and cognitive function. In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 20 (1 Suppl 1), S. 21–24.

Orth, Angela; Tapken, Daniel; Hollmann, Michael (2013): The delta subfamily of glutamate receptors: characterization of receptor chimeras and mutants. In: *The European Journal of Neuroscience* 37 (10), S. 1620–1630. DOI: 10.1111/ejn.12193.

Oshima, Naoki; Onimaru, Hiroshi; Yamagata, Akira; Itoh, Seigo; Matsubara, Hidehito; Imakiire, Toshihiko et al. (2018): Erythropoietin, a putative neurotransmitter during hypoxia, is produced in RVLM neurons and activates them in neonatal Wistar rats. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. DOI: 10.1152/ajpregu.00455.2017.

Patriarchi, Tommaso; Amabile, Sonia; Frullanti, Elisa; Landucci, Elisa; Lo Rizzo, Caterina; Ariani, Francesca et al. (2016): Imbalance of excitatory/inhibitory synaptic protein expression in iPSC-derived neurons from FOXG1(+/-) patients and in foxg1(+/-) mice. In: *European journal of human genetics : EJHG* 24 (6), S. 871–880. DOI: 10.1038/ejhg.2015.216.

Pendyala, Gurudutt; Chou, Shinnyi; Jung, Yoosun; Coiro, Pierluca; Spartz, Elizabeth; Padmashri, Ragunathan et al. (2017): Maternal Immune Activation Causes Behavioral Impairments and Altered Cerebellar Cytokine and Synaptic Protein Expression. In: *Neuropsychopharmacology* 42 (7), S. 1435. DOI: 10.1038/npp.2017.7.

Petralia, Ronald S.; Wang, Ya-Xian; Zhao, Hui-Min; Wenthold, Robert J. (1996): Ionotropic and metabotropic glutamate receptors show unique postsynaptic, presynaptic, and glial localizations in the dorsal cochlear nucleus. In: *Journal of Comparative Neurology* 372 (3), S. 356–383. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960826)372:3<356::AID-CNE3>3.0.CO;2-1.

Remy, I.; Wilson, I. A.; Michnick, S. W. (1999): Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. In: *Science* 283 (5404), S. 990–993.

Robinson, Shenandoah; Corbett, Christopher J.; Winer, Jesse L.; Chan, Lindsay A. S.; Maxwell, Jessie R.; Anstine, Christopher V. et al. (2018): Neonatal erythropoietin mitigates impaired gait, social interaction and diffusion tensor imaging abnormalities in a rat model of prenatal brain injury. In: *Experimental neurology* 302, S. 1–13. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.12.010.

Roche, K. W.; Ly, C. D.; Petralia, R. S.; Wang, Y. X.; McGee, A. W.; Bredt, D. S.; Wenthold, R. J. (1999): Postsynaptic density-93 interacts with the delta2 glutamate receptor subunit at parallel fiber synapses. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (10), S. 3926–3934.

- Rong, Yongqi; Bansal, Parmil K.; Wei, Peng; Guo, Hong; Correia, Kristen; Parris, Jennifer; Morgan, James I. (2018): Glycosylation of Cblns attenuates their receptor binding. In: *Brain research* 1694, S. 129–139. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.05.022.
- Ryu, Kyounghee; Yokoyama, Marie; Yamashita, Manami; Hirano, Tomoo (2012): Induction of excitatory and inhibitory presynaptic differentiation by GluD1. In: *Biochemical and biophysical research communications* 417 (1), S. 157–161. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.075.
- Safieddine, S.; Wenthold, R. J. (1997): The glutamate receptor subunit delta1 is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (19), S. 7523–7531.
- Sakanaka, Masahiro; Wen, Tong-Chun; Matsuda, Seiji; Masuda, Seiji; Morishita, Emi; Nagao, Masaya; Sasaki, Ryuzo (1998): In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (8), S. 4635–4640.
- Salah-Hussiesy, Safaa; Mamchur, Anatolii; Odeh, Amani; Domankevich, Vered; Shams, Imad (2018): Reduced calcium influx in the hypoxia-tolerant *Spalax*: The role of the erythropoietin receptor. In: *Cell calcium* 74, S. 123–130. DOI: 10.1016/j.ceca.2018.07.004.
- Sambrook, Joseph; Russell, David William (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santhanam, Anantha Vijay R.; Katusic, Zvonimir S. (2006): Erythropoietin and cerebral vascular protection: role of nitric oxide. In: *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (11), S. 1389–1394. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2006.00441.x.
- Schmid, SabineM.; Hollmann, Michael (2008): To Gate or not to Gate: Are the Delta Subunits in the Glutamate Receptor Family Functional Ion Channels? Molecular Neurobiology. In: *Mol Neurobiol* 37 (2-3), S. 126–141. DOI: 10.1007/s12035-008-8025-0.
- Schutter, D. J. L. G. (2009): Antidepressant efficacy of high-frequency transcranial magnetic stimulation over the left dorsolateral prefrontal cortex in double-blind sham-controlled designs: a meta-analysis. In: *Psychological medicine* 39 (1), S. 65–75. DOI: 10.1017/S0033291708003462.

Seigneur, Erica; Südhof, Thomas C. (2017): Cerebellins Are Differentially Expressed in Selective Subsets of Neurons Throughout the Brain. In: *The Journal of comparative neurology* 525 (15), S. 3286–3311. DOI: 10.1002/cne.24278.

Shen, Ying; Yu, Hui-Min; Yuan, Tian-Ming; Gu, Wei-Zhong; Wu, Yi-Dong (2009): Erythropoietin attenuates white matter damage, proinflammatory cytokine and chemokine induction in developing rat brain after intra-uterine infection. In: *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 29 (5), S. 528–535. DOI: 10.1111/j.1440-1789.2009.01005.x.

Sherwood, J. B. (1984): The chemistry and physiology of erythropoietin. In: *Vitam Horm* 41, S. 161–211.

Shingo, Tetsuro; Sorokan, S. Todd; Shimazaki, Takuya; Weiss, Samuel (2001): Erythropoietin Regulates the In Vitro and In Vivo Production of Neuronal Progenitors by Mammalian Forebrain Neural Stem Cells. In: *J. Neurosci.* 21 (24), S. 9733–9743. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/21/24/9733.full.pdf>.

Siddiqui, Tabrez J.; Craig, Ann Marie (2011): Synaptic organizing complexes. In: *Current opinion in neurobiology* 21 (1), S. 132–143. DOI: 10.1016/j.conb.2010.08.016.

Singhal, N. K.; Alkhayer, K.; Shelestak, J.; Clements, R.; Freeman, E.; McDonough, J. (2018): Erythropoietin Upregulates Brain Hemoglobin Expression and Supports Neuronal Mitochondrial Activity. In: *Molecular Neurobiology*. DOI: 10.1007/s12035-018-0971-6.

Sirén, Anna-Leena; Knerlich, Friederike; Poser, Wolfgang; Gleiter, Christoph H.; Brück, Wolfgang; Ehrenreich, Hannelore (2001): Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. In: *Acta Neuropathol* 101 (3), S. 271–276. DOI: 10.1007/s004010000297.

Sivertsen, Einar Andreas; Hystad, Marit Elise; Gutzkow, Kristine Bjerve; Døsen, Guri; Smeland, Erlend Bremertun; Blomhoff, Heidi Kiil; Myklebust, June Helen (2006): PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. In: *British Journal of Haematology* 135 (1), S. 117–128. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06252.x.

Song, Ge; Wu, Qing-Ping; Xu, Ting; Liu, Ya-Li; Xu, Zeng-Guang; Zhang, Shi-Fu; Guo, Zhan-Yun (2015): Quick preparation of nanoluciferase-based tracers for novel

bioluminescent receptor-binding assays of protein hormones: Using erythropoietin as a model. In: *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 153, S. 311–316. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.10.014.

Stankewich, Michael C.; Gwynn, Babette; Ardito, Thomas; Ji, Lan; Kim, Jung; Robledo, Raymond F. et al. (2010): Targeted deletion of β III spectrin impairs synaptogenesis and generates ataxic and seizure phenotypes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (13), S. 6022–6027. DOI: 10.1073/pnas.1001522107.

Stopka, T.; Zivny, J. H.; Stopkova, P.; Prchal, J. F.; Prchal, J. T. (1998): Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. In: *Blood* 91 (10), S. 3766–3772.

Sun, Yun; Calvert, John W.; Zhang, John H. (2005): Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. In: *Stroke* 36 (8), S. 1672–1678. DOI: 10.1161/01.STR.0000173406.04891.8c.

Suryavanshi, Pratyush S.; Gupta, Subhash C.; Yadav, Roopali; Kesharwani, Varun; Liu, Jinxi; Dravid, Shashank M. (2016): Glutamate Delta-1 Receptor Regulates Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling in the Hippocampus. In: *Mol Pharmacol* 90 (2), S. 96–105. DOI: 10.1124/mol.116.104786.

Tamarelle, Sophie; Ghaboura, Nehmat; Treguer, Frederic; Khachman, Dalia; Croue, Anne; Henrion, Daniel et al. (2009): Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 297 (6), H2035–43. DOI: 10.1152/ajpheart.00472.2009.

Tiwari, Neeraj K.; Sathyanesan, Monica; Schweinle, William; Newton, Samuel S. (2019): Carbamoylated erythropoietin induces a neurotrophic gene profile in neuronal cells. In: *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 88, S. 132–141. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.07.011.

Treutlein, Jens; Mühleisen, Thomas W.; Frank, Josef; Mattheisen, Manuel; Herms, Stefan; Ludwig, Kerstin U. et al. (2009): Dissection of phenotype reveals possible association between schizophrenia and Glutamate Receptor Delta 1 (GRID1) gene promoter. In: *Schizophrenia research* 111 (1-3), S. 123–130. DOI: 10.1016/j.schres.2009.03.011.

Tsai, Peter T.; Ohab, John J.; Kertesz, Nathalie; Groszer, Matthias; Matter, Cheryl; Gao, Jing et al. (2006): A Critical Role of Erythropoietin Receptor in Neurogenesis and Post-Stroke Recovery. In: *J. Neurosci.* 26 (4), S. 1269–1274. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4480-05.2006.

Uemura, Takeshi; Lee, Sung-Jin; Yasumura, Misato; Takeuchi, Tomonori; Yoshida, Tomoyuki; Ra, Moonjin et al. (2010): Trans-Synaptic Interaction of GluR δ 2 and Neurexin through Cbln1 Mediates Synapse Formation in the Cerebellum. In: *Cell* 141 (6), S. 1068–1079. DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.035.

Umeda, Kanae; Kotake, Yaichiro; Miyara, Masatsugu; Ishida, Keishi; Sanoh, Seigo; Ohta, Shigeru (2016): Methoxychlor and fenvalerate induce neuronal death by reducing GluR2 expression. In: *The Journal of Toxicological Sciences* 41 (2), S. 255–264. DOI: 10.2131/jts.41.255.

Uttine, G. Eda; Haliloglu, Goknur; Salanci, Bilge; Cetinkaya, Arda; Kiper, P. Ozlem; Alanay, Yasemin et al. (2013): A homozygous deletion in GRID2 causes a human phenotype with cerebellar ataxia and atrophy. In: *Journal of child neurology* 28 (7), S. 926–932. DOI: 10.1177/0883073813484967.

Villmann, Carmen; Strutz, Nathalie; Morth, Tanja; Hollmann, Michael (1999): Investigation by ion channel domain transplantation of rat glutamate receptor subunits, orphan receptors and a putative NMDA receptor subunit. In: *European Journal of Neuroscience* 11. DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00594.x.

Volbracht, Christiane; Penzkofer, Stephan; Mansson, David; Christensen, Kenneth Vielsted; Fog, Karina; Schildknecht, Stefan et al. (2009): Measurement of cellular beta-site of APP cleaving enzyme 1 activity and its modulation in neuronal assay systems. In: *Analytical biochemistry* 387 (2), S. 208–220. DOI: 10.1016/j.ab.2009.01.008.

Wang, Lei; Chopp, Michael; Gregg, Sara R.; Zhang, Rui Lan; Teng, Hua; Jiang, Angela et al. (2008): Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28 (7), S. 1361–1368. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.32.

Wang, Lei; Zhang, Zhenggang; Wang, Ying; Zhang, Ruilan; Chopp, Michael (2004): Treatment of Stroke With Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis

and Improves Neurological Function in Rats. In: *Stroke* 35 (7), S. 1732–1737. DOI: 10.1161/01.STR.0000132196.49028.a4.

Warmuth, Markus; Kim, Sungjoon; Gu, Xiang-ju; Xia, Gang; Adrián, Francisco (2007): Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. In: *Current opinion in oncology* 19 (1), S. 55–60. DOI: 10.1097/CCO.0b013e328011a25f.

Watowich, Stephanie S. (2011): The erythropoietin receptor: molecular structure and hematopoietic signaling pathways. In: *J. Investig. Med.* 59 (7), S. 1067–1072. DOI: 10.231/JIM.0b013e31820fb28c.

Webb, Bradley T.; Edwards, Alexis C.; Wolen, Aaron R.; Salvatore, Jessica E.; Aliev, Fazil; Riley, Brien P. et al. (2017): Molecular Genetic Influences on Normative and Problematic Alcohol Use in a Population-Based Sample of College Students. In: *Frontiers in genetics* 8, S. 30. DOI: 10.3389/fgene.2017.00030.

Wells, J. A.; Vos, A. M. de (1996): Hematopoietic receptor complexes. In: *Annu Rev Biochem* 65, S. 609–634. DOI: 10.1146/annurev.bi.65.070196.003141.

Wieronska, Joanna M.; Zorn, Stevin H.; Doller, Dario; Pilc, Andrzej (2016): Metabotropic glutamate receptors as targets for new antipsychotic drugs: Historical perspective and critical comparative assessment. In: *Pharmacology & therapeutics* 157, S. 10–27. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.10.007.

Wollmuth, Lonnie P.; Sobolevsky, Alexander I. (2004): Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. In: *Trends in Neurosciences* 27 (6), S. 321–328. DOI: 10.1016/j.tins.2004.04.005.

Xu, Xiang; Dai, Haibin; Shi, Yulan (2009): Erythropoietin protects primary cultures of rat cortical neurons from hypoxia-induced toxicity through attenuating both glutamate release and NMDA receptor evoked neurotoxicity pathway. In: *Die Pharmazie* 64 (3), S. 210–213.

Yadav, Roopali; Gupta, Subhash C.; Hillman, Brandon G.; Bhatt, Jay M.; Stairs, Dustin J.; Dravid, Shashank M. (2012): Deletion of Glutamate Delta-1 Receptor in Mouse Leads to Aberrant Emotional and Social Behaviors. In: *PLOS ONE* 7 (3), e32969. DOI: 10.1371/journal.pone.0032969.

Yadav, Roopali; Rimerman, Ronald; Scofield, Margaret A.; Dravid, Shashank M. (2011): Mutations in the transmembrane domain M3 generate spontaneously open

orphan glutamate delta1 receptor. In: *Brain research* 1382, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.12.086.

Yamanaka, Katsuhiko; Eldeiry, Mohamed; Aftab, Muhammad; Mares, Joshua; Ryan, Thomas J.; Meng, Xianzhong et al. (2018): Optimized induction of beta common receptor enhances the neuroprotective function of erythropoietin in spinal cord ischemic injury. In: *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2017.12.132.

Yamasaki, Makiko; Mishima, Hiromu K.; Yamashita, Hidetoshi; Kashiwagi, Kenji; Murata, Kazuhiko; Minamoto, Atsushi; Inaba, Toshiya (2005): Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. In: *Brain research* 1050 (1-2), S. 15–26. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.05.037.

Yamazaki, M.; Araki, K.; Shibata, A.; Mishina, M. (1992): Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. In: *Biochemical and biophysical research communications* 183 (2), S. 886–892.

Yan, Dongqing; Hutchison, Robert E.; Mohi, Golam (2012): Tyrosine 201 is required for constitutive activation of JAK2V617F and efficient induction of myeloproliferative disease in mice. In: *Blood* 120 (9), S. 1888–1898. DOI: 10.1182/blood-2011-09-380808.

Yasumura, Misato; Yoshida, Tomoyuki; Lee, Sung-Jin; Uemura, Takeshi; Joo, Jae-Yeol; Mishina, Masayoshi (2012): Glutamate receptor $\delta 1$ induces preferentially inhibitory presynaptic differentiation of cortical neurons by interacting with neurexins through cerebellin precursor protein subtypes. In: *Journal of Neurochemistry* 121. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07631.x.

Yoo, Seung-Jun; Cho, Bongki; Lee, Deokho; Son, Gowoon; Lee, Yeong-Bae; Soo Han, Hyung et al. (2017): The erythropoietin-derived peptide MK-X and erythropoietin have neuroprotective effects against ischemic brain damage. In: *Cell death & disease* 8 (8), e3003. DOI: 10.1038/cddis.2017.381.

Yoshimura, A.; Arai, K. (1996): Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction. In: *Oncologist* 1 (5), S. 337–339.

Yuzaki, M. (2009): New (but old) molecules regulating synapse integrity and plasticity: Cbln1 and the delta2 glutamate receptor. In: *Neuroscience* 162 (3), S. 633–643. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.002.

Yuzaki, Michisuke (2012): The ins and outs of GluD2--why and how Purkinje cells use the special glutamate receptor. In: *Cerebellum (London, England)* 11 (2), S. 438–439. DOI: 10.1007/s12311-011-0328-4.

Yuzaki, Michisuke; Aricescu, A. Radu (2017): A GluD Coming-Of-Age Story. In: *Trends in Neurosciences* 40 (3), S. 138–150. DOI: 10.1016/j.tins.2016.12.004.

Zanjani, Hadi S.; Vogel, Michael W.; Mariani, Jean (2016): Deletion of the GluRδ2 Receptor in the Hotfoot Mouse Mutant Causes Granule Cell Loss, Delayed Purkinje Cell Death, and Reductions in Purkinje Cell Dendritic Tree Area. In: *The Cerebellum* 15 (6), S. 755–766. DOI: 10.1007/s12311-015-0748-7.

Zhang, Feng; Signore, Armando P.; Zhou, Zhigang; Wang, Suping; Cao, Guodong; Chen, Jun (2006): Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: Potential signaling mechanisms. In: *Journal of Neuroscience Research* 83 (7), S. 1241–1251. DOI: 10.1002/jnr.20816.

Zhang, Tianxiao; Hou, Liping; Chen, David T.; McMahon, Francis J.; Wang, Jen-Chyong; Rice, John P. (2018): Exome sequencing of a large family identifies potential candidate genes contributing risk to bipolar disorder. In: *Gene* 645, S. 119–123. DOI: 10.1016/j.gene.2017.12.025.

Zhao, Pu; Zhang, Si-He; Jan, Tavernier; Li, Yu; Chen, Zhi-Nan (2007): Development of recombinant HEK293-16 cell strain expressing chimera receptor EpoR/LR-F3/HAb18GEF with site-specific integration expression system. In: *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* 23 (3), S. 213–216.

Zhong, Chen; Shen, Jinlong; Zhang, Huibing; Li, Guangyi; Shen, Senlin; Wang, Fang et al. (2017): Cbln1 and Cbln4 Are Structurally Similar but Differ in GluD2 Binding Interactions. In: *Cell reports* 20 (10), S. 2328–2340. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.031.

Thesen

1. Das Grid1-Gen kodiert für die Glutamat-Rezeptor-Delta-1-Untereinheit (GluD1), die in verschiedenen Regionen des ZNS exprimiert wird. Die Funktion des Proteins, insbesondere sein Potential als ionotroper Rezeptor ist noch unklar.
2. Erythropoietin (EPO) hat neben seinen Wirkungen im hämatopoetischen System eine Reihe von überwiegend protektiven Effekten in neuronalen Geweben und induziert die Expression des Grid1-Gens in Zellen verschiedenen Typs, darunter auch in HEK-293-Zellen, in denen der EPO-Rezeptor überexprimiert vorliegt.
3. Grid1 wird darüberhinaus in diesen Zellen durch experimentell erzeugte Hypoxie verstärkt transkribiert.
4. Zur näheren Analyse der Grid1-Aktivierung wurde der bisher nur teilweise bekannte Grid1-Promoter der Ratte aus genomischer DNA kloniert und entsprechende Reportergenkonstrukte hergestellt.
5. Plasmide mit dem Grid1-Promoter wurden transient in Ba/F3-Zellen transfiziert und durch den Einsatz Signalweg-spezifischer Inhibitoren die EPO-abhängige Geninduktion analysiert.
6. EPO aktiviert den Grid1-Promoter konzentrationsabhängig. Die gleichzeitige Überexpression von Wildtyp bzw. dominant negativen Varianten der in den EPO-Signaltransfer involvierten Tyrosinkinasen JAK2 und Lyn führt zu Expressionsveränderungen, die auf eine Beteiligung beider Kinasen bei der Aktivierung des Grid1-Gens schließen lassen.
7. Die Wirkung verschiedener Inhibitoren der JAK/STAT-, MAPKinase- und PI3-Kinase-Signalwege macht deutlich, dass diese, im EPO-Signaltransfer vielfach nachgewiesenen Aktivitäten auch bei der Induktion des Grid1-Gens entscheidend sind.
8. Zur Analyse auf Proteinebene wurde das Grid1-Gen kloniert und in HEK-293-Zellen mit stabiler Überexpression des EPO-Rezeptors transfiziert. Nach Stimulation der Zellen mit EPO konnte eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden.

9. In einer Zelllinie mit neuronaler Charakteristik (ST14A) wurden – nach stabiler Expression des EPO-Rezeptors – Kopräzipitationsexperimente durchgeführt, um eine mögliche physische Assoziation mit anderen Glutamatrezeptoren zu klären. Dabei gelang der Nachweis der Assoziation von GluD1 mit dem ionotropen Glutamatrezeptor NR2A.
10. Die vorliegenden Resultate sprechen für eine EPO-abhängige Regulation des Grid1-Gens und seines Produktes, dem GluD1-Rezeptor.
11. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit einer möglichen Beteiligung des GluD1-Rezeptors an der glutamatergen Neurotransmission und dem neuroprotektiven Potential von EPO diskutiert.